

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer

ENTWICKLUNG EINES BIOSENSORS

ZUM SIMULTANEN NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN UND TOXINEN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
Der Tierärztlichen Fakultät
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Helen Anna Hetzelt

aus
München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. B. Schalch

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Allgemeines	2
2.2	Immunchemische Grundlagen	3
2.3	Antikörper-Microarrays.....	4
2.3.1	Oberflächen.....	4
2.3.2	Herstellung.....	15
2.4	Detektion	17
2.5	Wesentliche Eigenschaften der Zielantigene	18
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
3.1	Materialien und Geräte	23
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	23
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	25
3.1.3	Immunreagenzien.....	26
3.1.4	Geräte	28
3.1.5	Verwendete Biochips.....	29
3.1.6	Sonstige Materialien.....	29
3.2	Methodik	30
3.2.1	Herstellung und Überprüfung markierter Antikörper	30
3.2.1.1	Markierung mit Biotin.....	30
3.2.1.2	Markierung mit Digoxigenin.....	31
3.2.1.3	Markierung mit Fluorochromen.....	31
3.2.2	Durchführung des Sandwich-EIA	32
3.2.3	Ergebnisse	33
3.2.3.1	Nachweis von <i>Yersinia pestis</i>	33
3.2.3.2	Nachweis von <i>Coxiella burnetii</i>	38

3.2.3.3	Nachweis von <i>Francisella tularensis</i>	42
3.2.3.4	Nachweis von Shiga-like Toxin 1 (Stx 1)	48
3.2.3.5	Nachweis von Shiga-(like) Toxin 2 (Stx 2)	51
3.2.3.6	Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	53
3.2.3.7	Nachweis von Orthopox-Virus	57
3.2.3.8	Alternative Detektionsverfahren	60
3.2.3.9	Multi-Analyt-System im Mikrotiterplattenformat	66
3.2.4	Nachweis im Microarray-Format	68
3.2.4.1	Prinzipieller Aufbau des Biosensors	68
3.2.5	Etablierung eines automatisierten Versuchsdurchführung	71
3.2.6	Manuelle Versuchsdurchführung	73
3.2.7	Herstellung und Überprüfung von Microarrays	73
3.2.7.1	Microarray-Spotter	73
3.2.7.2	Überprüfung verschiedener Biochip-Oberflächen	75
3.2.8	Optimierung der Microarray-Verfahren	89
3.2.8.1	Aldehyd-aktivierte Biochips	89
3.2.8.2	FAST-Slides	92
3.2.8.3	Fluoreszenzmarkierte Antikörper	98
3.2.9	Implementierung von Kontrollansätzen	99
3.2.10	Sensitivität der entwickelten Microarray-Verfahren	100
4	DISKUSSION	103
4.1	Erstellung eines uniformen Testsablaufs	103
4.2	Etablierung von Microarray-Verfahren	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
7	ANHANG	124

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alexa-CSE	Alexa-Carbonsäure-Succinimidyl-Ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzym-linked-Immuno-Sorbent-Assay
ELMI	Elektronenmikroskop
Fab	Funktionelle Antigen Bindungsstelle (eines Antikörpers)
HRP	Horseraddish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HUS	Hämolytische urämische Syndrom
IFL	Immunfluoreszenz
IMB	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
KbE	Kolonie bildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
LD ₅₀	Dosis bei der 50 % der Versuchstiere sterben
LPS	Lipopolysaccharid
LVS	Living vaccination strain
mAk	monoklonaler Antikörper
NHS	N-hydroxy-succinimide
NMP	Nine Mile Phase
pAk	polyklonaler Antikörper
Part. /ml	Partikel pro ml
PASA	paralleler Affinitätssensor-Array
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
POD	Peroxidase
SanAkBw	Sanitätsakademie der Bundeswehr
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Stx	Shiga-like toxin
TSB	Trypton-Soja-Broth
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
vacc	Vakzinavirus (Pocken Impfstamm)

1 EINLEITUNG

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen stellen pathogene Mikroorganismen und deren Toxine eine große Gefahr für die Gesundheit dar. Um eine mögliche Exposition rechtzeitig zu erkennen und die daraus resultierenden Gesundheitsschäden effektiv behandeln zu können, sind empfindliche und schnelle Nachweisverfahren für eine sichere Diagnosestellung unerlässlich. Gegenwärtig erfolgt der Nachweis von Viren, Bakterien und ihren Toxinen in für das Agens maßgeschneiderten Einzeltests, wie z. B. personal- kosten- und zeitaufwendigen und störanfälligen Zellkulturtechniken oder molekularbiologischen und immunologischen Verfahren sowie zum Teil noch im Tierversuch.

Zur Realisierung eines simultanen Nachweisverfahrens für gesundheitsschädliche Agenzien sollte in diesem Forschungsprojekt eine völlig andere Testkonzeption, nämlich ein Biosensor, entwickelt werden. Zur Verwirklichung dieser Idealvorstellung wurde im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes mit der TU München ein Biosensor-System entwickelt, das in Zukunft den automatisierten und parallelen Schnellnachweis von verschiedenen relevanten Erregern und ihren Toxinen ermöglichen soll. Prinzipiell basiert der Sensor auf der Kombination eines klassischen Sandwich ELISA mit moderner Microarray-Technologie und vereint damit die Vorteile beider Verfahren, wie das Potential zu Multianalytfähigkeit, Automatisierbarkeit, Miniaturisierung und Reduzierung der Testzeiten. Grundsätzlich erlaubt das generelle Konzept des Biosensors die Integration und Parallelisierung einer hohen Anzahl an Einzeltests. Das Zielspektrum kann beliebig erweitert und jederzeit aktuellen Bedürfnissen der Differentialdiagnostik angepasst werden, vorausgesetzt entsprechende individuelle robuste Detektions- und Fangantikörper stehen zur Verfügung.

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung der vorhandenen biologischen Komponenten im Einzeltest, Übertragung auf ein miniaturisiertes Multianalytformat (den Biochip), Entwicklung der Programmierung des Immunomats und die Optimierung des Testablaufs.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln des Bundesministeriums der Verteidigung gefördert,
Projektnummer: E/B 41 G/ OA 427 / OA 800

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines

Biosensoren finden zunehmend Anwendung in Medizin, Umweltanalytik und bei der Kontrolle von Lebensmitteln. Der Begriff Biosensor wird für einen Meßaufbau verwendet, in dem eine biologische oder eine biologisch erzeugte Komponente direkt oder indirekt mit einem physikalischen Signalwandler (z.B. einer Elektrode, einer optischen Faser, einem Piezokristall oder einem Transistor) verbunden ist. Die übliche Anwendung eines Biosensors ist die Erzeugung eines diskreten oder kontinuierlichen Signals, das zur Konzentration des Analyten direkt oder indirekt proportional ist. (TURNER, 1996). Entscheidende Vorteile von Biosensoren sind häufig ihre geringe Größe und Wiederverwendbarkeit, sowie die direkte, kontinuierliche Messung (ROGERS und GERLACH, 1996).

Ein breites Anwendungsfeld ergibt sich aus der Möglichkeit der Parallelisierung von Messvorgängen. Eine wesentliche Voraussetzung dazu ist die Immobilisierung verschiedener biologischer Komponenten auf einem Träger. Dies erfolgt über physikalische oder chemische Methoden bzw. durch eine Kombination aus beiden. Zu den physikalischen Methoden gehören die Adsorption oder die Einbettung von Enzymen in wasserunlösliche Gele und organische Polymere. Um Enzyme oder Antikörper kovalent an Träger zu binden, wird das Protein über bifunktionelle Reagenzien (z. B. wasserlösliche Carbodiimide) an reaktive Gruppen auf der Sensoroberfläche gekoppelt. Chemisch reaktive Gruppen eines Proteins sind Aminogruppen, Carboxylgruppen, Phenolreste, Sulfhydrylgruppen und Imidazolgruppen. Bei allen biologischen Rezeptoren ist dabei auf die korrekte Orientierung zu achten, um die chemische Selektivität von Enzymen, Antikörpern und Wirkstoffrezeptoren, sowie deren Affinität zu den Reaktionspartnern zu erhalten.

Das Microarray-Format, bei dem die Fangmoleküle in geringen Mengen auf einer mikroskopisch kleinen Fläche immobilisiert werden, ermöglicht außerdem Reaktionen in kleinen Volumina, wobei durch geringe Diffusionsstrecken für die Analyten in den Probenlösungen die Inkubationszeit verkürzt wird. Da die Konzentrationsänderung des gesuchten Stoffes, durch die Bindung an die Sensormoleküle zu vernachlässigen ist, kann gleichzeitig eine hohe Sensitivität erreicht werden (EKINS, 1989).

2.2 Immunchemische Grundlagen

Für immunchemische Verfahren wird die Fähigkeit von Antikörpern, Substanzen spezifisch zu binden, ausgenutzt, dabei werden sowohl polyklonale Antiseren als auch monoklonale Antikörper verwendet (KÖHLER und MILSTEIN, 1975).

Der Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen mit enzymmarkierten Reagenzien (Enzymimmunoassay, EIA) führt im Allgemeinen zu einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um mehrere Zehnerpotenzen. In der Durchführung erfordern Enzymimmuntests entweder markiertes Antigen oder markierte Antikörper als messbare Größe und können in zwei grundlegend verschiedene Systeme eingeteilt werden:

In kompetitiven Verfahren konkurrieren freies Antigen und markiertes oder festphasen-gebundenes Antigen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Die Messgröße ist meist das gebundene markierte Antigen, wodurch das Testergebnis umgekehrt proportional zu der Menge des gebundenen Antigens ist. Die kompetitiven EIA's werden hauptsächlich für den Nachweis von niedermolekularen Substanzen, die nur eine Antikörperbindungsstelle haben, eingesetzt.

In nicht-kompetitiven Verfahren wird eine begrenzte Anzahl von Antigenmolekülen von spezifischen Antikörpern, die teilweise markiert sind, gebunden. Um die größtmögliche Sensitivität zu erreichen, ist die Messgröße in der Regel der gebundene, markierte Antikörper, wobei das Testergebnis direkt proportional zu der Menge des gebundenen Antigens ist. Mit diesem Verfahren können nur Moleküle einer gewissen Mindestgröße bestimmt werden, da mindestens zwei Antikörperbindungsstellen (Epitope) am Molekül vorhanden sein müssen, die sterisch so positioniert sind, dass das Molekül von zwei (unterschiedlichen) Antikörpern gebunden werden kann. Das Sandwich-Format gehört zu den nicht-kompetitiven EIA's, dabei wird ein Antikörper auf der Festphase immobilisiert, welcher das gesuchte Antigen bindet, ein zweiter, markierter Antikörper detektiert das gebundene Antigen.

Im Vergleich zu anderen nicht kompetitiven Verfahren, wie den Antigen-Capture-Assays, wird die Probenaufbereitung im Sandwich-Format sehr erleichtert, da die Probe nicht markiert werden muss. Ein weiterer großer Vorteil des Sandwich-Ansatzes ist die Spezifität, ein großer Nachteil besteht, daß für jedes gesuchte Protein zwei spezifische nicht konkurrierende Antikörper benötigt werden. (MAC BEATH, 2002).

2.3 Antikörper-Microarrays

Eine entscheidende Schwierigkeit bei auf Antikörper basierenden Microarray-Formaten liegt im Verlust der biologischen Aktivität während der Immobilisierung, sowie im Auftreten von unspezifischen Background-Signalen. So berichten z.B. SCHWEITZER et al. (2002) über massive Probleme mit unspezifischen Reaktionen, die dazu führten, dass etwa die Hälfte der implementierten Immunreagenzien zum Nachweis von Zytokinen (37 monoklonale Antikörper bzw. polyklonale Antiseren) durch alternative Produkte ersetzt werden musste.

Wiederverwendbare Rezeptorflächen durch den Einsatz inerte Materialien wie Ganglioside, Kunststoffe, Zucker oder Silikone zu produzieren, hat bisher nur Modellcharakter (MAY, 2004). Zur Erstellung von analytischen Arrays stellen deshalb Antikörper im Hinblick auf Spezifität und Affinität trotz der oftmals bemängelten Stabilität nach wie vor das Mittel der Wahl dar (CUTLER, 2003).

2.3.1 Oberflächen

Eine Oberfläche, auf der Antikörper gebunden werden sollen, muss laut ANGENDT et al. (2002) drei Schlüsselqualifikationen in sich vereinen: Erstens die optimalen Bindungskonditionen mit hoher Bindungskapazität; anders als DNS mit ihrem uniformen negativ geladenen Phosphatrückgrat, besitzen Proteine keine uniforme äußere Hülle für die eine spezielle Oberfläche hergestellt werden könnte. Zweitens muss die Oberfläche für hohe Durchlaufleistungen und Sortierabläufe geeignet sein. Dies beinhaltet schnelle und preiswerte Produktion in hoher Zahl, Eignung für die gewählte Detektionsart, wie z.B. bei Fluoreszenzdetektion geringe Autofluoreszenz, einfache Handhabung während der Versuche und der Lagerung sowie hohe Reproduzierbarkeit. Da es bei Protein-Microarrays auf die interagierenden Partner ankommt, muss als drittes eine nicht denaturierende Umgebung gewährleistet sein, da Proteine dazu neigen sich in ihrer Faltung zu verändern wenn sie immobilisiert werden, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann.

Die Auswahl an Oberflächen für die Microarray-Technik ist inzwischen relativ groß, wobei die meisten allerdings speziell für die Immobilisierung von DNA und RNA gedacht sind. Darüber hinaus sind in der Literatur auch eine Vielzahl von „Rezepten“ beschrieben, um Glasoberflächen chemisch zu modifizieren (CRAS et al., 1999; KUSNEZOW et al. 2003).

Eine Auswahl von Verfahren zur Immobilisierung von Antikörpern ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Auswahl von bislang publizierten, auf Antikörpern basierenden Biochips

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
modifiziertes Polyacrylamid-Gelpads (Slides aktiviert mit Glutaraldehyd)	Enzymaktivitätsmessungen und Detektion von Zytokinen und BSA in verschiedenen Formaten, Beschleunigung der Diffusion durch Elektrophorese, Fluoreszenzdetektion;	Geringer Hintergrund, bei guter Immobilisierung der Proteine in Abhängigkeit von der Dicke des Pads, mehrfach verwendbar	ARENKOV et al.(2000)
modifiziertes Polyacrylamidgelpads (Slides aktiv durch teilweise Substitution der Amid-Gruppen durch Hydrazid-Gruppen)	Einfügen von Aldhyd-Gruppen in den Zuckeranteil der Antikörper zur gezielten Immobilisierung, Enzymaktivitätsmessungen und Detektion von Zytokinen und BSA in verschiedenen Formaten, Beschleunigung der Diffusion durch Elektrophorese, Fluoreszenzdetektion	Geringer Hintergrund bei besserer Immobilisierung der Antikörper, hohe Stabilität und fast doppelt so hohe Sensitivität als bei obigem Slide, mehrfach verwendbar	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Maxisorb schwarz und klar (Polystyren Oberfläche) [Nunc]	Direkte und indirekte EIA mit verschiedenen poly- und monoklonalen Antikörpern (teilweise Inaktivierung) in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Lagerbedingungen, Fluoreszenzdetektion	Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signal- Sättigung bei 1500 amol/spot; 2 wöchige Lagerung der beschichteten Slides verbessert die Sensitivität deutlich	ANGENENDT et al. (2002)
Polysine [Menzel]		Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signalsättigung bei 2000 amol/spot; 2 wöchige Lagerung verbessert die Sensitivität	
Hydrogel (modifiziertes Polyacrylamidgel) [Perkin Elmer]		Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signalsättigung bei 1500-2500 amol/spot; sehr hohe Varianz; 2 wöchige Lagerung verbessert die Sensitivität	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Reflective Microarray (3-Aminopropyltriethoxysilan) [Amersham Biosciences] (Poly-L-Lysine) ∞ (Polyacrylamidgelpad)	Direkte und indirekte EIA mit verschiedenen poly- und monoklonalen Antikörpern (teilweise Inaktivierung) in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Lagerbedingungen, Fluoreszenzdetektion	Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signalsättigung bei 2000 amol/spot; sehr geringe Varianz in und zwischen den Tests; 2 wöchige Lagerung verbessert die Sensitivität Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signalsättigung bei 2000 amol/spot; 2 wöchige Lagerung verbessert die Sensitivität Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; Signalsättigung bei 1500-1800 amol/spot; sehr hohe Varianz konnte durch Präinkubation in PBS verbessert werden; kein Einfluß durch pH oder von Immobilen	ANGENENDT et al. (2002)

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
(Poly-L-Lysine)	Direkte und indirekte EIA mit verschiedenen poly- und monoklonalen Antikörpern (teilweise Inaktivierung) in verschiedenen Konzentrationen, Fluoreszenzdetektion	Gutes Handling; robust und mittleres Signal/Rausch-Verhältnis; hohe Varianz; Signalsättigung erst bei 2500 amol/spot; Detektionsgrenze bei etwa 900 amol/spot	ANGENENDT et al. (2003b)
Dendrimer Slide (Dendrimer mit reaktiven Epoxy-Gruppen) [Chimera Biotech GmbH], Prototyp		Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; geringe Varianz; Signalsättigung bereits bei 940 amol/spot; Detektionsgrenze bei etwa 100 amol/spot	
PEG-Epoxy Slide (PEG Schicht mit reaktiven Epoxy-Gruppen) [Functional Genomics]		Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; geringe Varianz; Signalsättigung erst bei 3700 amol/spot; Detektionsgrenze bei etwa 400 amol	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Amine Slides (Aminosilan-Gruppen an Crosslinkern) [Telechem] silanisierte Slides (Aminosilan-Gruppen) [Telechem] Epoxy Slides (Epoxy-Gruppen) [Telechem] FAST Slides (Nitrocellulose) [Schleicher & Schuell]	Direkte und indirekte EIA mit verschiedenen poly- und monoklonalen Antikörpern (teilweise Inaktivierung) in verschiedenen Konzentrationen, Fluoreszenzdetektion	Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; hohe Varianz; Signalsättigung erst bei 3700 amol/spot; Detektionsgrenze bei etwa 400 amol Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; hohe Varianz; Detektionsgrenze bei etwa 400 amol Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis; hohe Varianz; Signalsättigung erst bei 3700 amol/spot; Detektionsgrenze bei etwa 400 amol Gutes Handling; robust und gutes Signal/Rausch-Verhältnis bei hohem Background; Detektionsgrenze bei 250 amol	ANGENENDT et al. (2003b)

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Polystyrene Zellkultur Slides (Polystyren) [Nalge Nunc Intern.]	Direkte und indirekte EIA mit verschiedenen poly- und monoklonalen Antikörpern (teilweise Inaktivierung) in verschiedenen Konzentrationen, Fluoreszenzdetektion	Gutes Handling; robust und schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis; hohe Varianz; Detektionsgrenze bei 1800 amol	ANGENENDT et al. (2003b)
Aminosilan Slides (Aminosilan) [Sigma] und [Corning]	Detektion von Zytokinen mit Antikörpern, Vergleich von Oberflächen, teilweise mit Crosslinkern,	Schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis; mindere Spotqualität	KUSNEZOW et al. (2003)
FAST Slides (Nitrocellulose) [Schleicher & Schuell]	Spottingpuffern, Blocklösungen und Lagerung; Fluoreszenzdetektion. Aktivierte Antikörper zeigten kein	Sehr hohes Signal hoher Background; mindere Spotqualität	
QMT Epoxy Slides (Epoxy) [Quantifoil micro Tools]	besseres Ergebnis als nicht aktivierte.	Gutes Signal/Rausch-Verhältnis; gute Spotqualität	
Aldehyd Slides (Aldehyd) [TeleChem]		Gutes Signal; zu hoher Background; gute Spotqualität	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
APTS Slides (Aminosilan)	Detektion von Zytokinen mit Antikörpern, Vergleich von Oberflächen,	Schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis; mindere Spotqualität	KUSNEZOW et al. (2003)
GPTS Slides (Glycidoxysilan)	teilweise mit Crosslinkern, Spottingpuffern, Blocklösungen und	Gutes Signal/Rausch-Verhältnis; gute Spotqualität	
MPTS Slides (Mercaptosilan)	Lagerung; Fluoreszenzdetektion. Aktivierte Antikörper zeigten kein besseres Ergebnis als nicht aktivierte.	Schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis; niedriger Background; mindere bis gute Spotqualität; je nach Crosslinker	
PL Slides (Poly-L-Lysine)		Standard in dieser Versuchsserie	
FAST Slides (Nitrocellulose) [Schleicher & Schuell]	Detektion von Zytokinen im Sandwich-Format, Vergleich von Oberflächen, Spottingpuffern, Blocklösungen und Detektionsfarbstoffen (Fluoreszenz)	Beste Immobilisierung großer Mengen Antikörper ohne Verschmieren oder Verlaufen des Spotbildes; moderater Hintergrund bei Fluoreszenz	LI et al. (2003)
SuperEpoxy Slides (Epoxy) [Telechem]		Sehr feste Kopplung der Antikörper, allerdings oft verlaufene und verschmierte Spots; höchste Sensitivität unter den getesteten Glasslides	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Silyated Slides (Aldehyd) [Cel Associates]	Detektion von Zytokinen im Sandwich- Format, Vergleich von Oberflächen, Spottingpuffern, Blocklösungen und Detektionsfarbstoffen (Fluoreszenz)	Gute Kopplung der Antikörper; waschen und Blocken verursachen ein Verschmieren der Spots, v. a. bei hohen Proteinkonzentrationen; moderate Sensitivität	LI et al. (2003)
(poly-L-Lysine Slides) [Cel Associates]		Mäßige Kopplung der Antikörper; verschmierte und verlaufene Spots bei mittelmäßiger bis schwacher Sensitivität	
13 Silanated Slides (Amin) [Cel Associates]		Schwache Kopplung der Antikörper; relativ gutes Spotbild aber geringste Sensitivität unter den getesteten Slides	

Fortsetzung Tabelle 1

Bezeichnung (Oberflächenbeschaffenheit) [Hersteller]	Einsatz	Eignung	Autor
Streptavidin beschichtete Poly-L-Lysin Slides	Detektion von Zytokinen mit Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten die gerichtet oder ungerichtet biotinyliert wurden; SPR Messung	Großer Unterschied zwischen gerichteter und ungerichteter Biotinylierung im Hinblick auf Aktivität sowie Bindungskapazität; die besten Resultate erzielten die gerichtet biotinylierten Fab-Fragmente	PELUSO et al. (2003)
Polyacrylamid Gel	DNA, Antikörper und Enzyme in verschiedenen Testformaten; Polymerisation des Gels durch an die gespotteten Reagenzien gekoppelte Methacrylsäure unter Einwirkung von UV Licht; Detektion mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz- bzw. MALDI-TOF	Immobilisierung großer Mengen an Protein pro Spot (bis zu 100 fmol/2 nl); geringe Varianz; mehrere Monate haltbar; bis zu 100 fach stärkere Signale als in 2-D Microarrays	RUBINA et al. (2003)
Supermolekulares Hydrogel aus glycosyliertem Aminoacetat	Messung von Enzymaktivitäten und Umsetzungsraten; Gel-Spots werden gespottet und polymerisieren spontan	Aktivität der Enzyme bleibt erhalten; keine Vergleiche mit anderen Gel-Pads	KIYONAKA et al. (2004)

2.3.2 Herstellung

Die Herstellung der Arrays auf den Oberflächen erfolgt meist automatisiert. Gängige Verfahren hierbei sind das Auftragen der Proteinlösungen mit Nadeln im Kontaktverfahren, das kontaktfreie Aufbringen mittels Piezospotterkopf, Tintenstrahldruckers (RODA et al., 2000) oder durch Photolithographie. Meist sind die Geräte aus dem DNA-Bereich übernommen worden (TAUSSIG, 2003). All diese Methoden haben aber ihre Nachteile, insbesondere die Genauigkeit sowie Reproduzierbarkeit des Auftrags und die Kompatibilität mit hohen Durchsatzraten gelten als kritische Punkte. Bei Nadel-Druckern kommt hinzu, dass sie für Polyacrylamidgele nicht geeignet sind, da sie die Oberfläche verletzen. Dafür sind bei den Piezospottern, die sehr genaue Spotbilder produzieren, meist Vorratsgefäße aus Glas im Einsatz, die aufgrund der potentiellen Bindung von Proteinen nicht ideal sind (CUTLER, 2003). Eine Auflistung der Firmen, die zurzeit Spotter herstellen, ist bei GLÖKLER und ANGENENDT. (2003) zu finden.

Ein Problem beim Spotten von Proteinen ist, diese auf der Oberfläche zu immobilisieren ohne sie zu denaturieren. Durch die geringe Größe haben Spots eine unverhältnismäßig große Oberfläche zur Luft und zum festen Substrat. Außerdem kann die Substratoberfläche an sich schon denaturierend wirken oder zumindest die Aktivität mindern. Das Problem potenziert sich, wenn die auf einem Array immobilisierten Proteine sehr unterschiedliche Eigenschaften besitzen (MITCHELL, 2002).

KUSNEZOW et al. (2003) verglichen 5 verschiedene Spottingpuffer miteinander und kamen zu dem Ergebnis, dass deren pH-Wert erstaunlicherweise kaum Auswirkungen hat. Ihre besten Ergebnisse erzielten sie mit PBS mit einem Zusatz von 0,5 % Trehalose. Höhere Konzentrationen an Trehalose erhöhten den Hintergrund, niedrigere hatten gar keinen Effekt. Auch der Zusatz von Glycerin in unterschiedlichen Konzentrationen wurde untersucht, resultierte jedoch in einer Reduktion des Signals und führte in höheren Konzentrationen (ab 10 %) zu einem verschmierten Spotbild. Im Hinblick auf die, zum Spotten verwendeten, Antikörperkonzentrationen wurden Lösungen mit 1 mg/ml als optimal bewertet, höhere Konzentrationen führten hingegen zu einer schlechteren Performance des Microarray.

Dagegen berichten LI et al. (2003), die von vier verschiedene Spotlösungen für Fast Slides verglichen, dass neben einem kommerziellen Produkt von Schleicher & Schuell, PBS mit einem Zusatz von 30 % Glycerin und EDTA die besten Ergebnisse erzielte.

DELEHANTY und LIGLER (2003) verwendeten beim Aufbringen von biotinylierten Antikörpern auf Streptavidin beschichtete Slides mittels Piezospotter 10 mmol/l PBS mit 0,1 % BSA.

KUSNEZOW et al (2003) verglichen auch verschiedene Blockierungslösungen (PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA bzw. Casein mit einem kommerziellen Produkt von Sigma Aldrich (TopBlock)). Für ihre Versuchsanordnung erwies sich TopBlock in einer Konzentration von 3 % als die beste Lösung, im Hinblick auf längere Lagerzeiten wurden noch Zusätze von 1 % Trehalose und 0,02 % Natriumazid verwendet. Die Inkubationszeiten für den Blockierungsschritt lag bei 4,5 h. Bei ANGENENDT et al (2002 u. 2003) wurden die Biochips in 3 % Casein/TBS-T bei 4°C über 1 h unter leichter Bewegung geblockt. LI und REICHTERT (2003) blocken ihre FastSlides (Nitrozellulosemembran auf Glas) in PBS mit 5 % Succrose, 3% Tween und 0,1 % Natriumazid über 1,5 h. Verglichen mit dem Blocken mit PBS mit Zusatz von 1 % BSA oder einem kommerziellen Produkt der Fa. Schleicher und Schuell wurden damit die besten Ergebnisse erzielt. Mehrfach wurde in der Literatur darauf hingewiesen, dass proteinhaltige Blocklösungen für eine Fluoreszenzdetektion nicht geeignet seien, da sie eine Autofluoreszenz aufweisen.

ANGENENDT et al. (2002) lagerten verschiedene Biochips nach Trocknung bei Raumtemperatur, bzw. im Kühlschrank über Nacht und einem anschließenden Blockschritt mit 3 % Casein/TBS-T entweder trocken oder in der Blocklösung, wobei die trockene Lagerung in höheren Signalwerten resultierte. Die stärksten Signale wurden überraschenderweise zwei Wochen nach der Herstellung gemessen.

Eine Möglichkeit das Problem der Lagerfähigkeit zu umgehen und die Backgroundproblematik in den Griff zu bekommen, wird wiederum von ANGENENDT et al. (2003a) beschrieben. In ihrem Versuchsaufbau wurden die Slides erst bei Bedarf gespottet und die markierte Probe sogleich danach mit einem weiteren Nadel-Spotterkopf auf die zuvor generierten Spots aufgetragen.

Eine sehr lange Haltbarkeit für unbespottete Slides konnte bei KUSNEZOW et al. (2003) bei einer Lagerung unter und ohne Argon bei 4°C festgestellt werden. Dabei war die Entwicklung durch die „Reifung“ unterschiedlich. Einige Slides zeigten unter Argongasatmosphäre nach zwei Monaten die besten Resultate, andere entwickelten sich ohne besondere Atmosphäre nach 4 Monaten besser, wobei dies auch für die Antikörpersysteme unterschiedlich ausgeprägt war. Die Verbesserung der Signalintensität nach einer „Reifung“ von mindestens einem Monat wurde bei bespotteten wie auch leeren Slides beobachtet.

Eine monatelange Lagerfähigkeit von Proteinbiochips in einer hydrophilen Umgebung erreichten RUBINA et al. (2003).

2.4 Detektion

Im Gegensatz zu katalytischen Biosensoren, bei welchen meist eine elektrochemische Detektion bevorzugt wird, werden bei Affinitätsbiosensoren häufig optische Detektionsmethoden eingesetzt (TURNER, 2001). Daneben existieren weitere Detektionsverfahren wie Massenspektrometrie oder SPR (surface plasmon resonance) (MITCHELL, 2002), bei denen eine Markierung der Reagenzien nicht erforderlich ist. Im Hinblick auf hohe Testsensitivität und geringe Störanfälligkeit sind allerdings optische Systeme unter Verwendung von markierten Reagenzien am aussichtsreichsten (ROWE et al., 1999).

MAC BEATH (2002) beschreibt ein von seiner Forschungsgruppe entwickeltes Microarray-Verfahren, bei dem das gesuchte Antigen von einem Fangantikörper immobilisiert, von einem fluoreszenzmarkiertem Detektionsantikörper erfasst und von einem zweiten anders fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper eine spezifische Modifikation wie z. B. eine Phosphorylierung signalisiert wird. Im Prinzip erlaubt die zweifarbige Detektion eine genauere Quantifizierung der Proteine, ist jedoch relativ unempfindlich. Da keine Signalverstärkung stattfindet, wie z. B. bei der Chemilumineszenz, können die Analyten typischerweise bis zu einer Konzentration von etwa 1 ng /ml detektiert werden. Eine enzymatisch katalysierte Signalverstärkung verbessert die Sensitivität um mindestens 3 Größenordnungen.

Da die bisherige optische Detektion eigentlich ausschließlich mit gekühlten CCD Kameras erfolgt, welche teuer und in ihren Abmessungen relativ unhandlich sind, testeten GOLDEN

und LIGLER (2002) dazu im Vergleich den Einsatz von einer ungekühlten CCD Kamera, einem CMOS Chip und von Photodioden. Die Photodioden schnitten aufgrund ihrer schlechten Auflösung und geringen Sensitivität am schlechtesten ab, wohingegen der CMOS bei einem Viertel der Größe und 10 % der Kosten zwar nicht die Sensitivität der gekühlten CCD Kamera erreichte, aber sicherlich gerade für tragbare, robuste Systeme seine Berechtigung hat. Die ungekühlte CCD Kamera erwies sich bei Nachweisen von unter 100 ng/ml als nicht mehr zuverlässig.

Auch der in dieser Arbeit eingesetzte Parallele Affinitätssensor-Array (PASA) verwendet zur Detektion eine CCD-Kamera und wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von Wasserkontaminanten (WINKELMAIR et al., 1999; WELLER et al., 1999), in der Allergie-Diagnostik (FALL et al., 2003) und zum Nachweis von Antibiotika in Milch (KNECHT et al., 2004) im robusten, indirekten Format eingesetzt.

2.5 Wesentliche Eigenschaften der Zielantigene

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu demonstrieren, daß mit dem gewählten Biosensorsystem der Nachweis sehr unterschiedlicher Mikroorganismen und mikrobieller Toxine prinzipiell möglich ist. Unter dieser Prämisse wurden folgende Erreger bzw. Toxine als Modelle ausgewählt:

- Bakterien: Erreger aus den Familien *Enterobacteriaceae* (*Yersinia pestis*), Francisellen (*Francisella tularensis*) und der Rickettsien (*Coxiella burnetii*)
- mikrobielle Toxine: Shiga-like-toxin 1 (Stx 1), Stx 2, sowie SEB (Staphylokokken Enterotoxin B)
- Viren: Vaccinia Virus

Die Eigenschaften, Infektionswege und –verläufe, sowie die gängigen Nachweisverfahren und ihre Einstufung durch das CDC (Center for Disease Control and Prevention) sind in Tab. 2 beschrieben. Richtlinien zur Diagnostik und Therapie bakterieller und viraler B-Agenzien wurden zudem vor kurzem auch von einer Arbeitsgruppe (BICHAT; Task Force on Biological and Chemical Agent Threats) der europäischen Direktion für öffentliches Gesundheitswesen veröffentlicht (BOSSI et al., 2004).

Tabelle 2: *Eigenschaften der ausgewählten Mikroorganismen (BRANDIS und OTTE, 1984; CDC, 2000, DOHMH, 2004; GRUNOW et al., 2000; KEIL, 1999; KLEE et al., 2003; ROLLE und MAYR, 2001; SPLETTSTÖSSER et al. 2004; THOMSEN, 2003)*

Mikroorganismus/ Toxin	Eigenschaften	Infektionsweg/ -dosis	Vorkommen/ Reservoir	Nachweis	Einstufung der CDC/ Meldepflicht	Krankheitsbild
Bakterien						
19 <i>Yersinia pestis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	kokkoides	Tröpfcheninfektion,	Afrika und Asien	ELISA, PCR,	A/ ja	Inkubationszeit 2-6
	Stäbchen, 1 x 3	Arthropoden/ hohe	mit	IFL		Tage; Fieber, Sepsis,
	µm, Gram-neg.,	Kontagiosität nur	Endemiegebieten/			unbehandelt zu 50 %
	plasmid kodiertes	bei Lungenpest	Nager und			letal (Beulenpest)
	F1-Antigen; exprimiert ab 37°C		Arthropoden			bzw. 100 % letal (Lungenpest)

Fortsetzung Tabelle 2

Mikroorganismus/ Toxin	Eigenschaften	Infektionsweg/ -dosis	Vorkommen/ Reservoir	Nachweis	Einstufung der CDC/ Meldepflicht	Krankheitsbild
<i>Coxiella burnetii</i> (<i>Rickettsiaceae</i>)	obligat intrazellulär, kokkoides Stäbchen 1-2 x 0,3-0,7 µm, Gram- neg., bildet Dauerform	Inhalation und Arthropoden (Zecken) /hohe Tenazität und Kontagiosität	weltweit außer Neuseeland und Antarktis/ Säugetiere, v. a. Paarhufer und Arthropoden	KBR, IFL, ELISA, PCR, Zellkultur	B/ ja	Inkubationszeit 2-3 Wochen; Fieber, Abort, 50 % spontan Heilung
<i>Francisella tularensis</i>	pleomorphes Stäbchen, Gram- neg.	Kontakt, Verzehr, Inhalation/ hohe Tenazität und Kontagiosität	nördl. Hemissphäre/ kleine Säuger und Umwelt	PCR, ELISA, IFL	A/ja	Inkubationszeit 3-5 Tage; keine Ansteckung von Mensch zu Mensch, vielfältiges klin. Bild mit Fieber

Fortsetzung Tabelle 2

Mikroorganismus/ Toxin		Eigenschaften	Infektionsweg/ -dosis	Vorkommen/ Reservoir	Nachweis	Einstufung der CDC/ Meldepflicht	Krankheitsbild
Toxine							
21	Shigatoxin 1	AB-Toxin: A= 32 kDa, B = 7,7 kDa;	Lebensmittel, Wasser, Kontakt LD ₅₀ = 400 ng/Maus		ELISA, PCR, Zellkultur	B/ ja	Inkubationszeit: 1-5 Tage; Gastroenteritis, Durchfall, Fieber, HUS, TTP
	Shigatoxin 2	AB-Toxin: A = 33 kDa und B = 7,8kDa,	LD ₅₀ = 20 ng/Maus				
	SEB	Polypeptid, 28,366 Da	Lebensmittel/ Toxin B: emet. Dosis = 0,05- 0,4 µg/kg KGW.; hitzeresistent und wasserlöslich		ELISA, PCR, Tierversuch	B/ bei Häufung: ja	Inkubationszeit wenige Stunden, oral: Erbrechen aerogen: letal

Fortsetzung Tabelle 2

Mikroorganismus	Eigenschaften	Infektionsweg/-dosis	Vorkommen/ Reservoir	Nachweis	Einstufung der CDC/ Meldepflicht	Krankheitsbild
Vaccinia Virus (Orthopoxvirus, Impfstamm geg. Pocken)	Virion mit Doppelhülle, DNA	Geringe Kontagiosität, hohe Tenazität	Pocken sind lt. WHO bis auf verwahrte Bestände seit 1980 ausgerottet	ELMI, ELISA, PCR	A/ ja	Pockenbildung, Letalität bei immuninkompetenter Bevölkerung auf bis zu 50 % geschätzt

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton, getrocknet	(Riedel-de Haën, 32201)
Albumin vom Rind (BSA)	(Sigma Chemie GmbH, A-7030)
Albumin vom Schaf (SSA)	(Sigma Chemie GmbH, A-3264)
Albumin vom Mensch (HSA)	(Sigma Chemie GmbH, A-1653)
Alexa Fluor® 488–Succinimidyl-Ester	(Molecular Probes Inc., A20000)
Alexa Fluor® 647–Succinimidyl-Ester	(Molecular Probes Inc., A20006)
Ammoniumsulfat	(Riedel-de Haën, 31119)
Biotinamidocaprinsäure-NHS-Ester	(Sigma Chemie GmbH, B-2643)
Blocking agent	(Boehringer Mannheim GmbH, 1183117)
Casein aus Kuhmilch	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-NHS-Ester	(Roche, 1333054)
Dimethylsulfoxid	(Sigma Chemie GmbH, D-8779)
Dinatriumhydrogenphosphat	(Riedel-de Haën, 30427)
Elektrodenreiniger (Pepsin/HCl)	(Mettler-Toledo GmbH, 51340068)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma Chemie GmbH, E-1644)
Gelatine (aus Schweinehaut)	(Sigma Chemie GmbH, G-6144)
Glycerin	(Merck Eurolab GmbH, 4201)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Riedel-de Haën, 30407)
Methanol	(Riedel-de Haën, 32213)
Natriumazid	(Sigma Chemie GmbH, S-2002)
Natriumcarbonat	(Merck Eurolab GmbH, 6392.05)
Natriumchlorid	(Riedel-de Haën, 31434)
Natriumdihydrogenphosphat	(Carl Roth GmbH + Co., 6885.1)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck Eurolab GmbH, 1.06329.1000)
Ovalbumin	(Sigma Chemie GmbH, A-5253)
Peroxidase-Stabi-Lösung	(r-biopharm, SZ 02821)
Polyethylenglykol 20 000	(Merck-Schuchardt, 817018)
Saccharose	(Sigma Chemie GmbH, S-7903)

Schwefelsäure, konz.	(Merck Eurolab GmbH, 1.00731)
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Thimerosal	(Sigma Chemie GmbH, T-5125)
Trehalose	(Sigma Chemie GmbH, T4272)
Tween 20	(Merck-Schuchardt, 822184)
Wasserstoffperoxid	(Merck Eurolab GmbH, K1109497)
Zitronensäure-Monohydrat	(Merck Eurolab GmbH, 1.00244.5)

3.1.2 Puffer und Lösungen

Bicarbonatpuffer, 0,05 mol/l (pH 9,6)

Phosphatpuffer, 0,01 mol/l (pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl (PBS)

Phosphatpuffer, 0,01 mol/l (pH 8,2) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl (PBS/pH 8,2))

Phosphatpuffer, 0,01 mol/l (pH 8,4) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl (PBS/pH 8,4)

3 % (w/v) Casein/PBS-Lösung (30 g Natriumcaseinat/l PBS)

Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

0,21 mol/l Citratpuffer (pH 3,9) mit Zusatz von 3,15 mM H₂O₂

Tetramethylbenzidinlösung:

1 mmol/l 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol

1 mol/l Schwefelsäure

Polyethylenglykol 20 000-Lösung in A. dest., gesättigt

0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat Lösung (pH 8,5)

Substratlösung für Meerrettichperoxidase (HRP):

- nach GALLATI und PRACHT (1985): 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂ Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung
- chemilumineszierende Substratlösungen:
 - SuperSignal ELISA Femto (Pierce Chem. Comp., 37075)
 - SuperSignal ELISA Pico (Pierce Chem. Comp., 37070)
 - BM chemiluminescence ELISA Substrat (Roche, 1582950)
 - Chemiluminescence Detektion Kit (Applichem, A3417,1200)

3.1.3 Immunreagenzien

ExtrAvidin® Peroxidasr Konjugat (HRP)	(Sigma Chemie GmbH, E-2886)
Kaninchen-Anti-Maus-Ig	(DAKO A/S, Z0259)
Kaninchen-Anti-Maus-Ig-HRP	(DAKO A/S, P0161)
Kaninchen-Anti-Schaf-Ig	(DAKO A/S, Z0138)
Anti-Digoxigenin-POD (poly) Fab Fragmente vom Schaf	(Roche, 1207733)
Anti-Digoxigenin-POD Fab Fragmente vom Schaf	(Roche, 1207733)
Streptavidin, rekombinant	(Roche, 1207733)

Verwendete Nachweisantikörper

Eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper ist in Tabelle 3 dargestellt. Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich um monoklonale Antikörper, die in einem MiniPerm-System in Massen produziert und anschließend mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt worden waren. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden alle Hybridome mehrfach auf Antikörperproduktion getestet, zur Kontrolle mit der Limiting-Dilution Technik kloniert und danach kryokonserviert.

Tabelle 3: *Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper*

Antikörper	Spezifität	Herkunft
G20	F1 Antigen von <i>Yersinia pestis</i>	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
2F8	somat. Antigen von <i>Coxiella burnetii</i>	Prof. Dr. Dr. G. Baljer, JLU Gießen
FF 11/1/6	LPS von <i>Francisella tularensis</i>	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
rb- α - <i>F. tul.</i> ¹ Nr. 609 & 610	<i>Francisella tularensis</i>	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
13C4	B-Untereinheit von Stx 1	ATCC, CRL-1794
2H3	B-Untereinheit von Stx 1	KEIL, (1999)
1E1	A Untereinheit von Stx 2	KEIL, (1999)
1B5	A und B Untereinheit von Stx 2	KEIL, (1999)
sheep- α -SEB ²	Enterotoxin B von <i>Staph. aureus</i> (SEB)	JUNG, (1988)
5B1	Fusionsprotein von Orthopoxvirus	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
rb- α -vacc. ¹	Orthopoxvirus	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

¹polyklonale Kaninchen Antiseren

²affinitätschromatografisch gereinigte Antikörper

Verwendete Antigenpräparationen

Folgende Antigene und Antigenpräparationen wurden in dieser Arbeit verwendet:

- *Yersinia pestis*, Stamm 172 F1 Präparation (hitzeinaktiviert) bzw. Stamm EV 76, mittels Isopropanol bzw Formalin inaktivierte Präparation, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
- *Coxiella burnetii*, Gemisch aus NMP I+II und Isolat vom Rind, (inaktiviert), JLU Giessen, Prof. Baljer
- *Francisella tularensis*, LVS, ATCC 29684, (inaktiviert), Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
- Stx I - Toxoid: *E. coli* C600J1, siehe 3.2.3.4 bzw rekombinantes gereinigtes Stx I (Calbiochem 566810)
- Stx II - Toxoid: *E. coli* C600W34, siehe 3.2.3.5
- SEB - Toxin, SIMON (1978)
- Cowpox Brighten, β -Präparation, (inaktiviert), Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

3.1.4 Geräte

Mikrotiterplattentaumelgerät	(Heidolph GmbH)
Wasserstrahlpumpe RD-8 vacUBrand	(Brand GmbH + CO KG)
“Vortex” 2674 V 044	(Bender& Hobein AG)
Magnetheizrührer RCT IKAMAG	(IKA ® -Werke GmbH & CO. KG)
ELISA-Auto-Reader 400 AT	(SLT Crailsheim GmbH)
Laserjet 1300	(Hewlett Packard)
Spektrophotometer UV-160	(Shimadzu GmbH)
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0 RF	(Heraeus-Christ GmbH)
Piezospotter	(GeSiMmbH)
Immun-O-mat, Prototyp	(Attotec GmbH)
Notebook Omnibook XE3	(Hewlett Packard)
Auswertungssoftware Phoretix Totallab	(Nonlinear Dynamics Ltd.)
Multilabelcounter Viktor ³	(Perkin Elmer Inc.)
Steuerungssoftware MANTA	(Perkin Elmer Inc.)
Varipette “Reference”, div. Volumina	(Eppendorf AG)
Image Station IS 2000 MM	(Kodak Co.)

3.1.5 Verwendete Biochips

Folgende Slides (Biochips) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft:

QMT Aldehyd Slide	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, 110025)
Aldehydslide	(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 439002)
Nexterion® Slide A	(Schott Nexterion, Mainz, 1017771)
EPD Slide	(XanTec bioanalytics GmbH, Münster, SL EPD – 5)
QMT Epoxy Slide	(Schott Nexterion, Mainz, 100010)
Easy Spot Universal Slide	(Biocat GmbH, Heidelberg, UVG 001-25)
CX Slide	(XanTec bioanalytics GmbH, Münster, SL CX – 5)
HydroGel™ Slide	(Perkin Elmer™, Merden, 6050001)
MicroArray Slide, Clear Polymer	(Nunc™, Wiesbaden, 230302)
MicroArray Slide, Black Polymer	(Nunc™, Wiesbaden, 230305)
FAST Slide	(Schleicher & Schuell, Dassel, 10484182)
Vivid™ Gene Array Slides	(Pall life science GmbH, Dreieich, 5110)
Streptavidin Slide	(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 439003)
QMT Protein Slide	(Schott Nexterion, Mainz, 133005)

3.1.6 Sonstige Materialien

Mikrotiterplatten Maxisorp™(klar)	(Nunc GmbH, 439454)
Mikrotiterplatten Maxisorp™(weiß)	(Nunc GmbH, 436110)
Mikrotiterplatten FluoroNunc™(schwarz)	(Nunc GmbH, 437111)
Dialyseschlauch 16 mm	(Servapor, 44310)
Dialyseschlauch 22 mm	(Servapor, 44311)
Inkubationskammern für Objektträger, Volumen 500 µl	(Sigma Chemie GmbH, Z35,946-7)
Ultrazentrifugationseinheiten	(Milipore Corp., UFC9 03024)
Amicon Ultra-15, 30 kMWCO	

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung und Überprüfung markierter Antikörper

Um ein möglichst sensitives und einheitliches Testformat für alle Einzelnachweise zu erstellen, wurden für die Herstellung der Nachweisantikörper verschiedene Markierungsverfahren überprüft, wobei die Affinität der zur Verfügung stehenden Nachweisagencien ein entscheidendes Kriterium darstellte. Deswegen konzentrierten sich zunächst die Arbeiten auf die Biotinylierung bzw. Digoxigenierung der Detektionsantikörper, danach wurde im Hinblick auf eine deutliche Reduzierung der Testzeiten, selbige noch mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt.

3.2.1.1 Markierung mit Biotin

Zur Herstellung biotinylierter Antikörper wurden affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper durch Dialyse gegen Polyethylenglykol 20000 auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ml eingestellt und danach über Nacht gegen 0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat-Lösung (pH 8,0) dialysiert. Zur Kopplung wurde Biotin- ϵ -aminocapron-N-hydroxy-succinimid-Ester (Biotin-NHS-Ester) in DMSO ad 5 mg/ml gelöst und in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zugegeben. Reste des in DMSO gelösten Esters wurden bei -20°C gelagert und bis zu einem $\frac{1}{2}$ Jahr weiter verwendet. Es wurden je Antikörper mindestens 2 verschiedene Kopplungsansätze (molares Verhältnis Antikörper zu Biotin-NHS-Ester 1:88 bzw. 1:44) durchgeführt, da nicht auszuschließen war, dass die Kopplung zu vieler Biotin-Moleküle pro Antikörper die immunologische Aktivität bzw. Löslichkeit nachteilig beeinflusst. Die entsprechenden Ansätze wurden unter langsamem Rühren in Dunkelheit für 2 h inkubiert und die Kopplungsreaktion danach durch intensives Dialysieren gegen PBS (2 x 5 l) gestoppt und überschüssiges Biotin entfernt. Der Ansatz wurde nach photometrischer Messung (280 nm) der Proteinkonzentration mit 0,01 % Thimerosal zur Konservierung und 1 % bovinem Serumalbumin zur Stabilisierung versetzt und bis zu seiner Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der Kopplung wurde in den entsprechenden EIAs die Reaktivität der biotinylierten mAk mit der unbehandelten mAk's verglichen. Ergaben sich beim Vergleich der verschiedenen Kopplungsansätze (1:88 bzw. 1:44) Hinweise darauf, dass bei den Ansätzen mit höherer Biotin-Konzentration die immunologische Aktivität bzw. Löslichkeit des mAk negativ beeinflusst worden war, wurden weitere Kopplungen mit reduzierten

Biotin-NHS-Ester Konzentrationen durchgeführt, d. h. das molare Verhältnis von Antikörper zu Biotin-NHS-Ester betrug dann nur noch 1:22 bzw. 1:11.

3.2.1.2 Markierung mit Digoxigenin

Zur Markierung mit Digoxigenin wurden gereinigte Antikörper (1 mg/ml) über Nacht gegen 0,1 mol/l PBS (pH 8,4) dialysiert. Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimid-Ester (Dig-NHS-Ester) wurde in DMSO ad 40 mg/ml gelöst und in verschiedenen Verhältnissen (70:1; 35:1 bzw. 1:17,5) zur Antikörper-Lösung zugegeben. Reste des in DMSO gelösten Esters wurden bei -20°C gelagert und bis zu einem ½ Jahr weiter verwendet. Der Ansatz wurde dann im Dunkeln unter Rühren bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert und anschließend ausgiebig gegen PBS (pH 7,3; 3 x 5 l) dialysiert. Anschließend wurde die Konzentration der markierten Antikörper durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt, der Ansatz mit 1 % (w/v) bovinem Serumalbumin und 0,01 % Thimerosal versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Der Kopplungserfolg wurde in den entsprechenden antigenspezifischen EIAs überprüft, wobei die Reaktivität der digoxigenierten mAk direkt mit der der biotinylierten mAk verglichen wurde.

3.2.1.3 Markierung mit Fluorochromen

Zur Kopplung wurde der affinitätschromatographisch gereinigte und auf 2-5 mg/ml aufkonzentrierte Antikörper über Nacht gegen 0,1 mol/l PBS (pH 8,2) dialysiert. Alexa-carbonsäure-Succinimidyl-Ester (Alexa-CSE) wurde in DMSO ad 10 mg/ml gelöst, 100 µg Alexa-CSE pro 1 mg Antikörper zugegeben und dann im Dunkeln unter Rühren bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Zur Entfernung des ungekoppelten Fluorochroms wurde danach der Ansatz mit 10 ml PBS (pH 7,3) verdünnt, in Amicon Ultrazentrifugationseinheiten (Ausschlußgewicht 30 kDa) verbracht und bei 3000 xg für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Retentat wurde nochmals in 10 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration und der Kopplungsrate wurden die markierten Antikörper mit 0,1 % Natriumazid konserviert, mit 0,2 % BSA stabilisiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.2 Durchführung des Sandwich-EIA

Grundsätzlich erfolgte der Nachweis der entsprechenden Antigene in einem Sandwich-EIA. Dazu wurden Mikrotiterplatten über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit den Fangantikörpern (10 µg/ml Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität) beschickt. Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit 3 % -iger (w/v) Casein/PBS-Lösung (150 µl/Kavität) für 30 min und einem Waschschrift wurden Verdünnungsreihen (1:2) des Antigens (in PBS mit einem Zusatz von 0,5 % Tween 20; 100 µl/Kavität), sowie parallel dazu antigenfreie Kontrollen aufgetragen und dann für 1 h auf einem Mikrotiterplattentaumelgerät in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde das Antigen abgesaugt und es folgte ein weiterer Wasch- und Trockenschritt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des markierten Detektionsantikörpers, als Verdünnungslösung wurde 1 % -ige (w/v) Casein/PBS-Lösung teilweise mit Zusätzen von Tween20 verwendet (100 µl/Kavität). Die eingesetzte Konzentration an Nachweisantikörpern wurde in Vorversuchen optimiert und schwankte bei den verschiedenen Einzelnachweisen zwischen 1 und 2 µg/ml. Nach einstündiger Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurde Peroxidase-markiertes Extravidin bei Verwendung biotinylierter Nachweisantikörper bzw. sh- α -Digoxigenin-POD bei den digoxigenierten Detektionsantikörpern aufgetragen (1:2000 in 1 % -iger Casein/PBS-Lösung, 100 µl/Kavität) und erneut 1h inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift, folgte die Zugabe der Enzymsubstratlösung (100 µl/Kavität), die Umsetzungsreaktion wurde nach ausreichender Farbentwicklung (üblicherweise 20 min) mit 1 mol/l H₂SO₄ (100µl/Kavität) gestoppt und schließlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Die Modifikationen des Testablaufs bei Nachweisprinzipien, die nicht auf der Absorptionsmessung beruhten, sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

3.2.3 Ergebnisse

Bei der Optimierung der Einzeltests wurden neben den unterschiedlichen Markierungsverfahren für die Nachweisantikörper der Einfluss verschiedener anderer Parameter auf die Testcharakteristika überprüft, wobei hier insbesondere die Testsensitivität sowie die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes („Background“) im Vordergrund standen. Bei denjenigen Sandwich-EIAs, die sich durch einen sehr niedrigen Background ($<0,04$) auszeichneten, wurde die Nachweisgrenze definiert als diejenige Antigenkonzentration bei der im Test Extinktionswerte erreicht wurden, die dem zweifachen Wert der antigenfreien Kontrollen entsprachen. Bei den anderen Sandwich-EIA wurde nach DIN 58.967 zur Berechnung der Nachweisgrenze die Summe aus Background und dreifacher Standardabweichung der antigenfreien Kontrolle herangezogen.

3.2.3.1 Nachweis von *Yersinia pestis*

Zur Erstellung eines sensitiven Nachweissystems wurde wie in 3.2 beschrieben der verwendete mAk zum einen biotinyliert und zum anderen digoxigeniert, wobei bei beiden Kopplungsvarianten unterschiedliche molare Verhältnisse von Hapten zu mAk überprüft wurden. Bei den Biotinylierungsstudien zeigte sich, daß die besten Ergebnisse mit der Kopplungs-Variante 1:44 (Abb. 1) erzielt wurden. Bei niedrigen Konzentrationen konnte keine weitere Verbesserung der Sensitivität beobachtet werden, höhere Konzentrationen resultierten jedoch in einer deutlichen Reduktion der Antikörperaktivität. Die Einsatzkonzentration der markierten Nachweisantikörper spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle: in überprüften Konzentrationen im Bereich von 1-8 µg/ml ließen sich nur geringfügige Unterschiede bei den entsprechenden Standardkurven feststellen (Ergebnisse nicht dargestellt). Auffällig war aber eine diskrete Erhöhung der Extinktionswerte von 0,04 auf 0,05 des antigenfreien Kontrollansatzes.

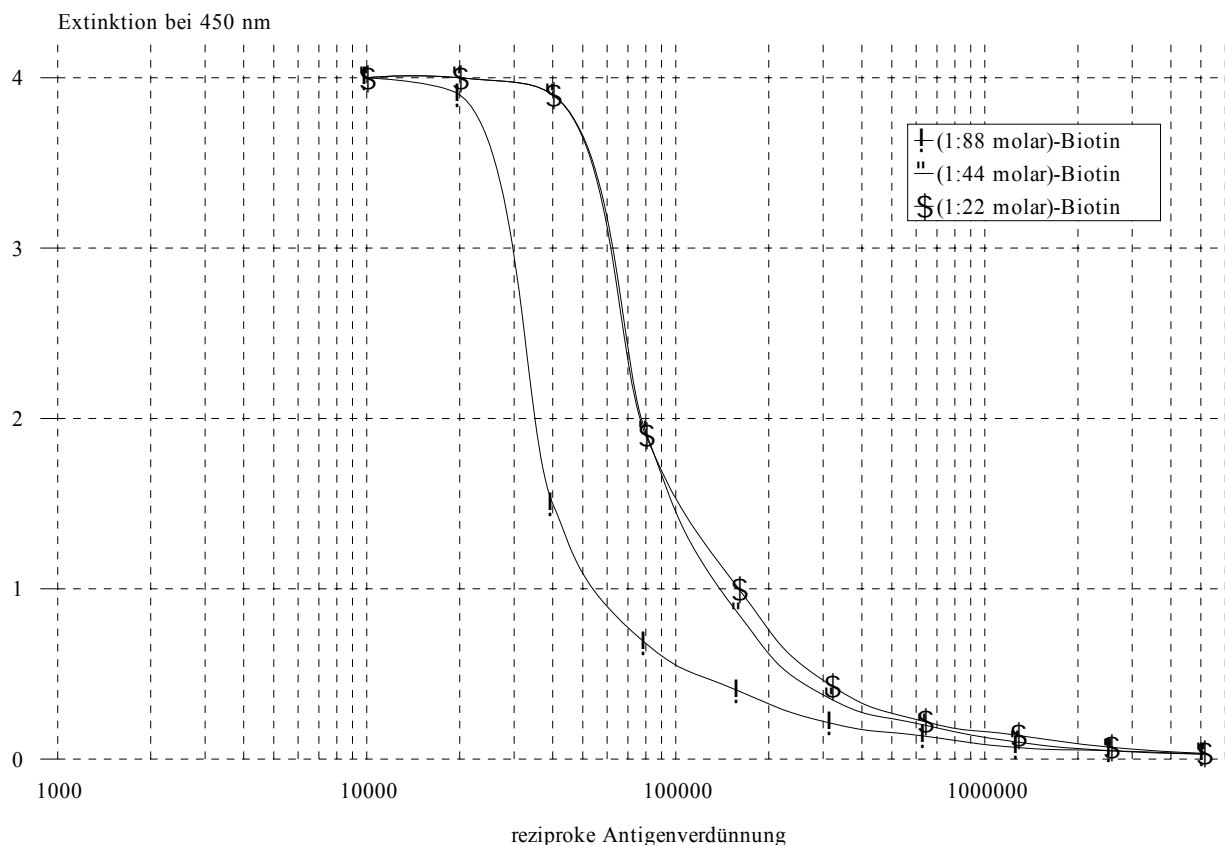


Abbildung 1: Vergleich der Standardkurven im Sandwich EIA zum Nachweis von *Yersinia pestis* bei Verwendung von unterschiedlich biotinylierten Nachweisantikörpern

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Digoxigenierung des mAk erhalten. Kopplungsansätze mit hohem molaren Überschuss an aktivierten Digoxigenin, wie sie vom Hersteller empfohlen werden, erwiesen sich im Sandwich-EIA als weniger sensitiv als die parallel überprüften, geringer digoxigenierten mAk-Präparationen. Prinzipiell konnte jedoch mit allen auf digoxigenierten mAk basierenden EIA-Varianten eine beträchtliche Sensitivitätssteigerung im Vergleich zum Biotin-Extravidin System beobachtet werden (Abb. 2). Im Zusammenhang mit der vergleichenden Untersuchung der unterschiedlich digoxigenierten mAk wurden auch verschiedene Peroxidase-markierte Anti-Digoxigenin Antikörper Fab bzw. (poly)-Fab Fragmente vom Schaf überprüft. Hierbei erwies sich die kostenintensivere "poly" Variante als etwas sensitiver (Abb. 3).

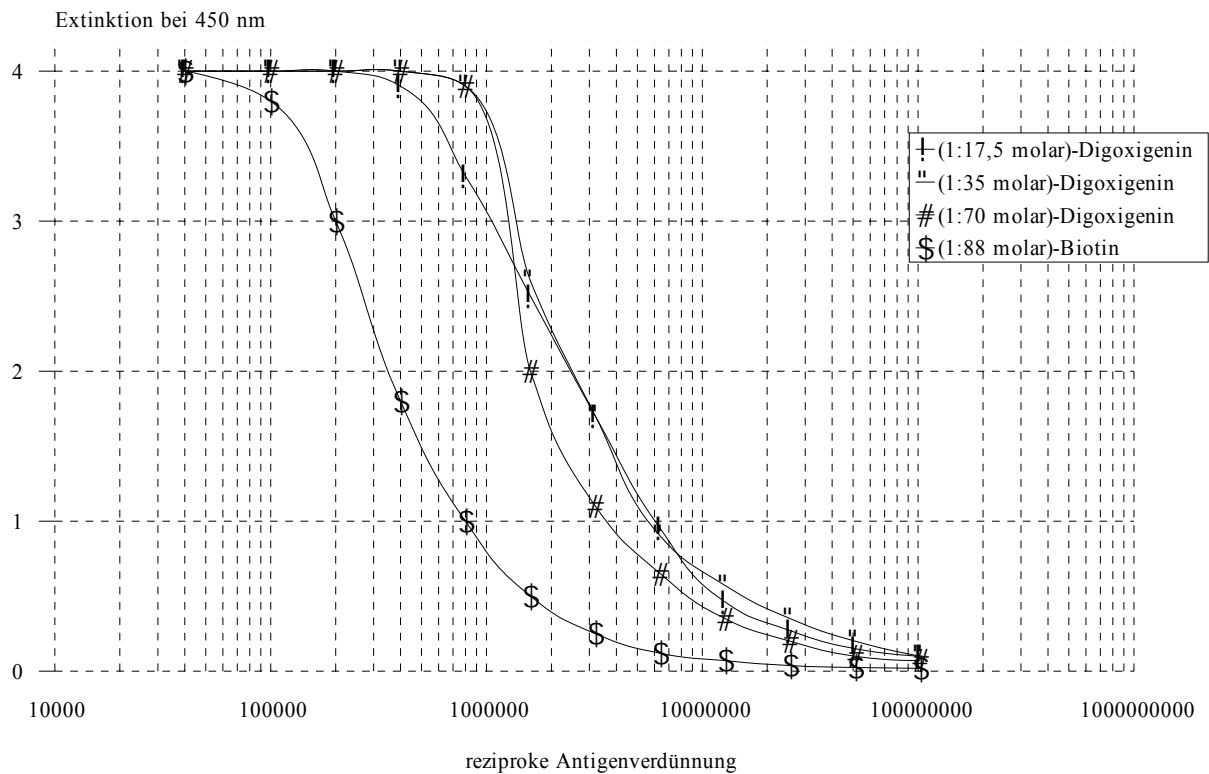


Abbildung 2: Vergleich der Standardkurven im Sandwich-EIA zum Nachweis von *Yersinia pestis* bei Verwendung unterschiedlich markierter Detektionsantikörper (Einsatzkonzentration 2 µg/ml)

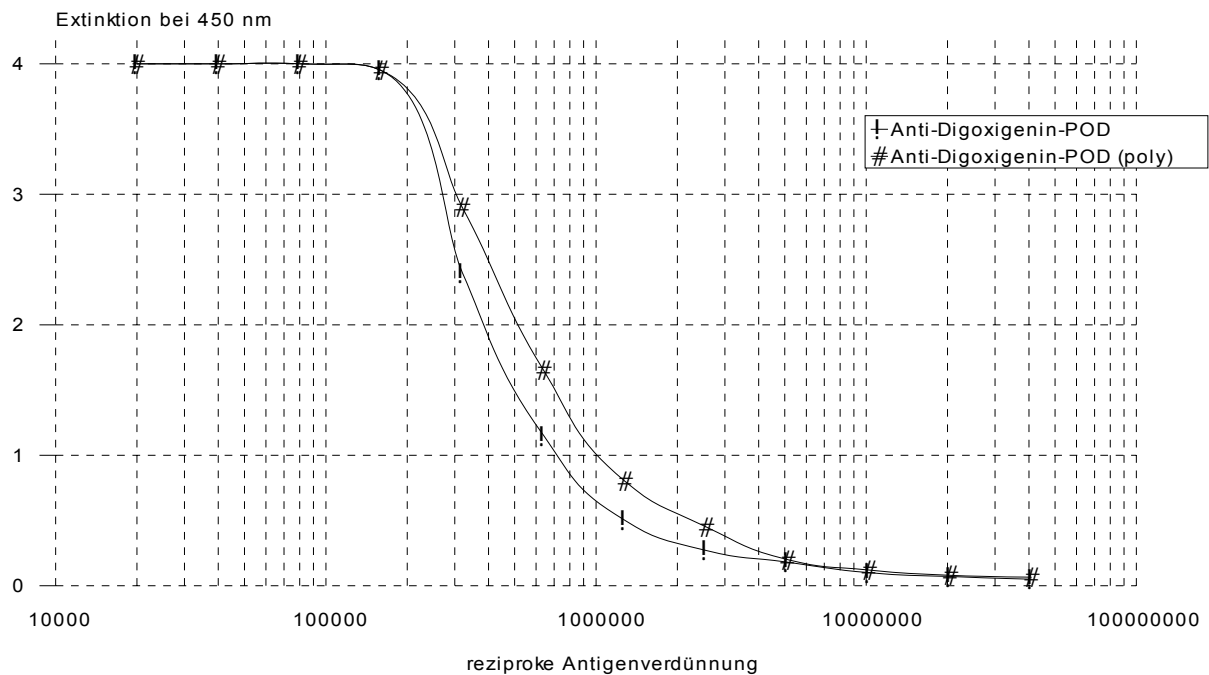


Abbildung 3: Vergleich verschiedener peroxidasemarkierter Anti-Digoxigenin-Antikörper im *Y. pestis*-EIA

Da das nachgewiesene F1-Antigen von *Yersinia pestis* bekanntermaßen hydrophobe Eigenschaften aufweist, wurde im Rahmen weiterer Untersuchungen zur Optimierung des Nachweisverfahrens überprüft, inwieweit durch den Zusatz von Tween 20 zur Antigen- bzw. zur Antikörperlösung eine weitere Sensitivitätssteigerung erzielt werden kann. Die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Richtigkeit dieser Überlegung. Durch Detergenz-Zusätze zu den Verdünnungslösungen konnte eine Verbesserung der Testsensitivität um bis zu Faktor 4 erreicht werden. Negative Effekte, wie eine deutliche Erhöhung des Backgrounds oder eine bei mAk manchmal zu beobachtende Intoleranz gegenüber höheren Detergenz-Zusätzen, traten hier nicht auf.

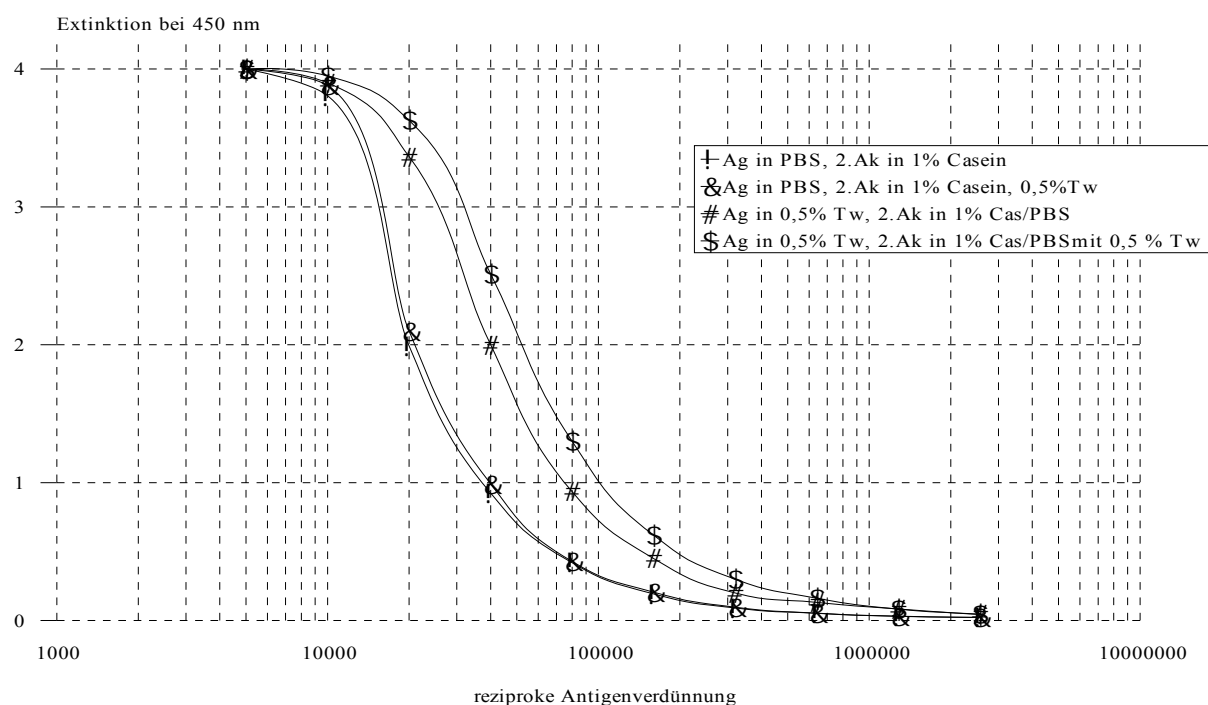


Abbildung 4: Sandwich-EIA zum Nachweis von *Yersinia pestis*: Einfluss von Tween 20 Zusätzen zu den Verdünnungslösungen auf den Verlauf der Standardkurven. Als Antigen (Ag) wurde eine hitzeinaktivierte *Y. pestis* Präparation verwendet, der biotinylierte Nachweisantikörper wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

Im Hinblick auf die praktische Anwendung des Testverfahrens spielt natürlich auch die zur Inaktivierung des Erregers verwendete Methodik eine große Rolle. Zur Überprüfung dieses Parameters standen drei mit unterschiedlichen Methoden inaktivierte Präparationen von *Y. pestis* zur Verfügung. Die EIA-Reaktivität dieser auf eine optische Dichte (560 nm) von 1,0 (entspricht 5×10^9 KbE/ml) eingestellten Keimsuspensionen zeigten beträchtliche Unterschiede (Abb. 5), wobei durch Hitzeinaktivierung des Erregers die Nachweisbarkeit des F1-Antigens am wenigsten beeinflusst wurde. Unter Berücksichtigung des oben erwähnten Ausgangskeimgehaltes ergab sich für diese Präparation eine rechnerische Nachweisgrenze beim digoxigenierten Nachweisantikörper von 2×10^3 KbE/ml $\pm 1 \times 10^3$ KbE/ml.

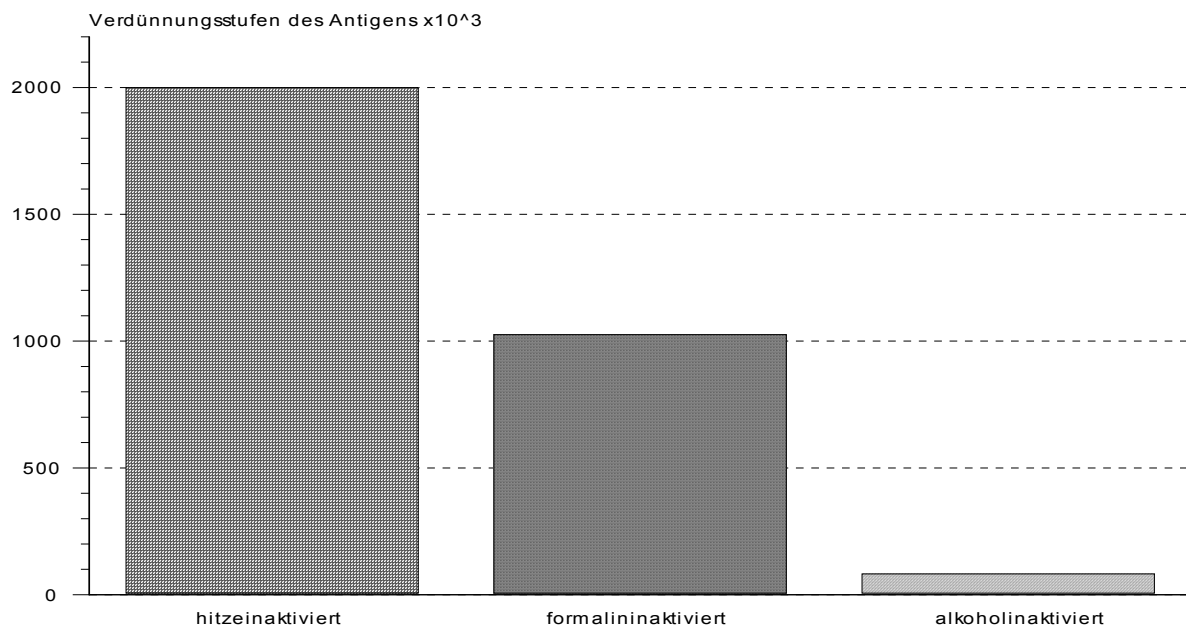


Abbildung 5: *Reaktivität von unterschiedlich inaktivierten Y. pestis Antigenpräparation im Sandwich-EIA, basierend auf den digoxigenierten Ak (1:35). Dargestellt sind die Endpunkttiter der Antigenpräparationen, definiert als zweifacher Extinktionswert des antigenfreien Kontrollansatzes.*

3.2.3.2 Nachweis von *Coxiella burnetii*

Der in diesem Testsystem verwendete mAk 2F8 erwies sich bei der Biotinylierung als relativ robust, so dass auch bei einer hohen Biotinkonzentration (molares Kopplungsverhältnis 1:88) kein Aktivitätsverlust des Antikörpers festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu den Erfahrungen beim *Yersinia pestis* Nachweis konnte hier jedoch beim Vergleich des digoxigeninierten mit dem biotinylierten mAk 2F8 keine wesentliche Sensitivitätssteigerung festgestellt werden (Abb. 6). Die Digoxigenin-Markierung des Antikörpers resultierte vielmehr in einer unerwünschten höheren Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (Background). Ursächlich hierfür dürfte sein, dass der Antikörper gegen *Coxiella burnetii* relativ hydrophob (IgG3-Subtyp) ist und deswegen dazu neigt, unter den Kopplungsbedingungen Präzipitate zu bilden.

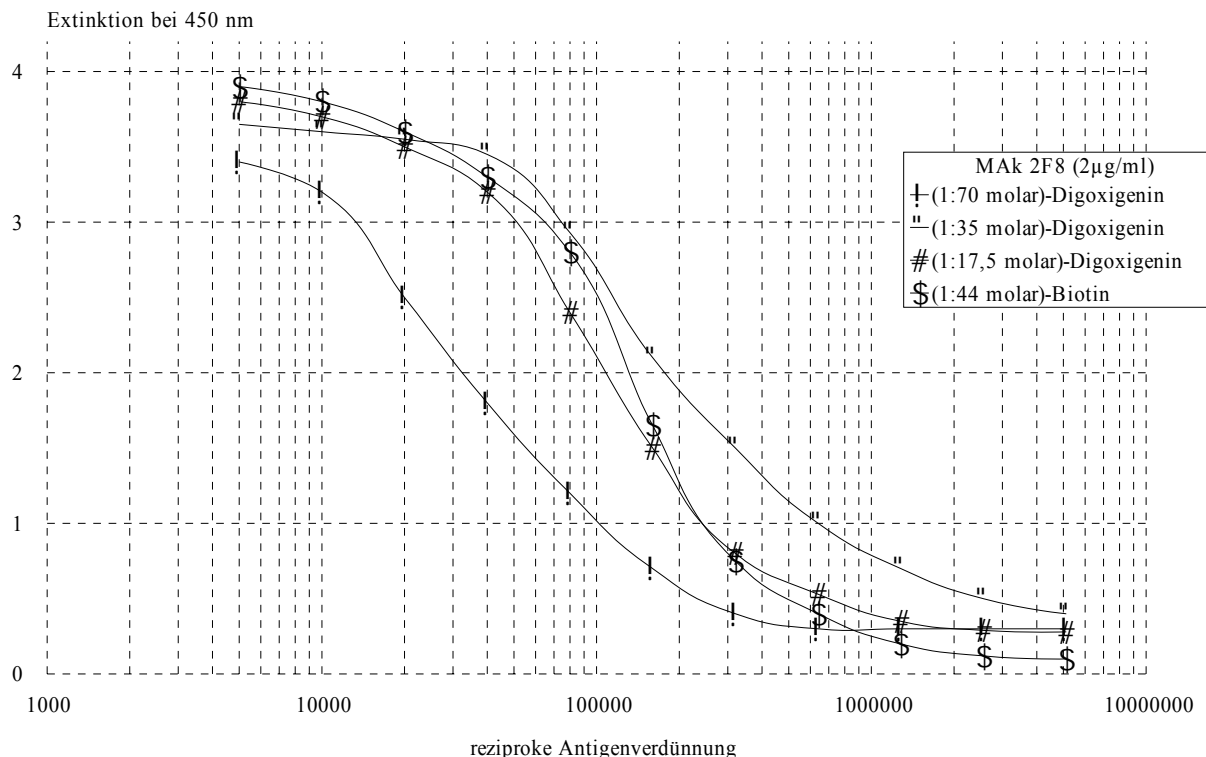


Abbildung 6: Vergleich der Standardkurven (inaktiviertes *Coxiella burnetii* Antigengemisch) bei Verwendung unterschiedlich markierter Detektionsantikörper (2 µg/ml in PBS mit Zusatz von 0,25 % Tween20)

Die Verwendung des biotinylierten mAk im Sandwich-EIA führte hingegen erst ab Konzentrationen von 2 µg/ml zu einem Anstieg der Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes von 0,03 auf 0,065, ein wichtiger Parameter bei der Optimierung im Hinblick auf den Multi-Analyt-Nachweis. Der Zusatz von 0,5 % Tween20 zur Antigen-Verdünnungslösung (PBS), der sich bereits beim Yersinien-Nachweis bewährt hatte, resultierte auch bei diesem Testsystem in einer ausgeprägten Verbesserung der Sensitivität – ein Effekt der noch gesteigert werden konnte, wenn die Verdünnungslösung des Nachweisantikörpers (1 % w/v Casein in PBS) ebenfalls mit Tween20 versetzt wurde (Abb. 7).

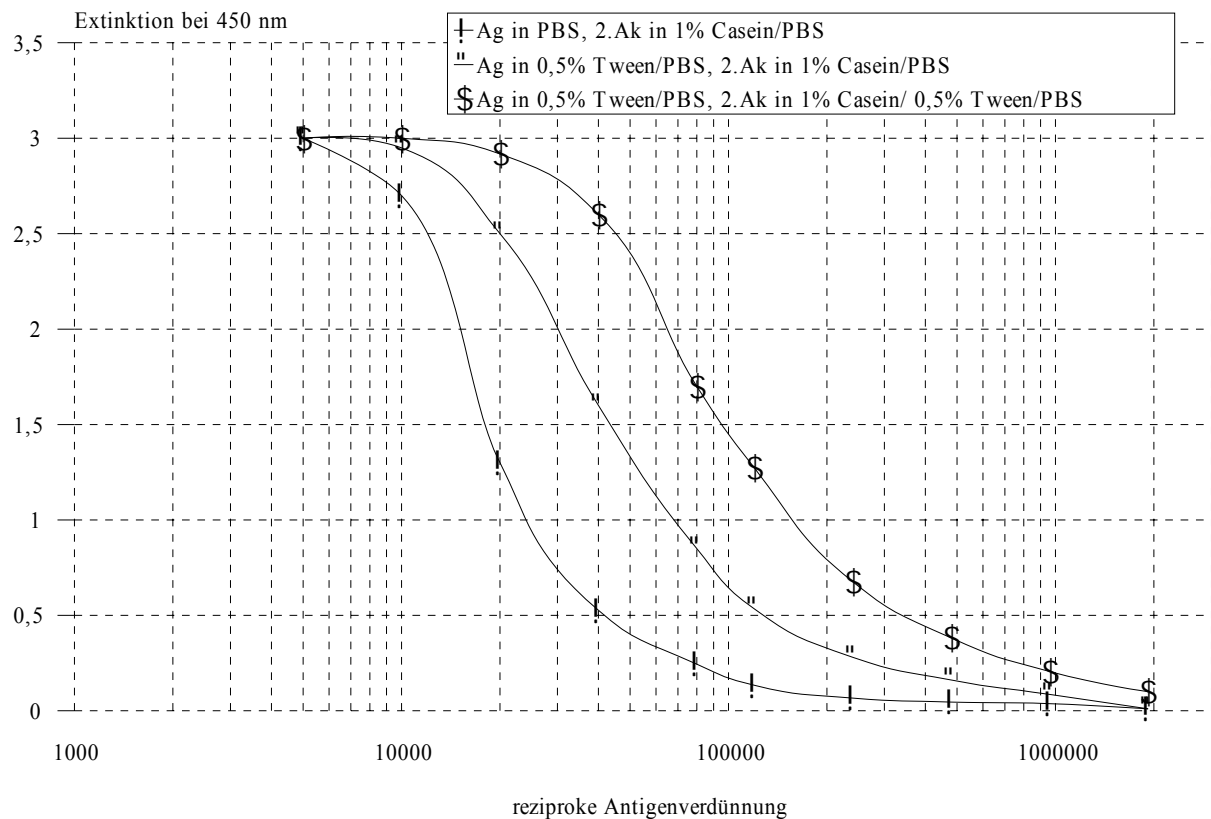


Abbildung 7: Sandwich-EIA zum Nachweis von *Coxiella burnetii*: Einfluss von Tween20 Zusätzen zu den Verdünnungslösungen auf den Verlauf der Standardkurven. Als Antigen (Ag) wurde ein hitzeinaktiviertes *Coxiella burnetii* Antigengemisch verwendet, der biotinylierte (1:88) Nachweisantikörper (2. Ak) wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

Letztere Variante führte allerdings auch zu einer deutlichen Erhöhung der Extinktion des Kontrollansatzes von 0,03 auf 0,08 – 0,12. Obwohl beim Einzelanalyt-Nachweis mittels Sandwich-EIA Background-Werte bis zu 0,1 tolerierbar sind, wurde im Hinblick auf den Multi-Analyt-Nachweis, bei dem ein Summationseffekt der Leerwerte der jeweiligen Einzelsysteme nicht auszuschließen war, versucht, durch Variationen der Antikörper-Verdünnungslösung eine Reduzierung der unspezifischen Bindungen zu erreichen. Diese in Tab. 4 zusammen gefassten Versuche führten jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis, Tween20 –Zusätze hatten in allen überprüften Konzentrationen(0,125-0,5 %) einen negativen Einfluss auf dieses Testcharakteristikum.

Die von Prof. Baljer, Gießen, zur Verfügung gestellte, inaktivierte Antigenpräparation von *Coxiella burnetii* enthielt vor der Inaktivierung etwa 3×10^{11} Part./ml. Dieses Material konnte im optimierten Testsystem noch in Verdünnungen von $> 1:1 \times 10^6$ nachgewiesen werden (Abb. 7). Daraus ergibt sich eine rechnerische Nachweisgrenze des EIA bei Verwendung biotinylierter Nachweisantikörper von $3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4$ Part./ml.

Tabelle 4: Einfluss verschiedener Zusätze zum Verdünnungsmedium des markierten Antikörpers auf den antigenfreien Kontrollwert beim *Coxiella burnetii* Nachweis

Markierung	Konzentration des mAk 2F8 [µg/ml]	Verdünnungslösung für den Nachweisantikörper (PBS mit Zusatz von...)	antigenfreier Kontrollwert
Biotin (1:88)	0,25	1 % Casein	0,02
Biotin (1:88)	0,5	1 % Casein	0,025
Biotin (1:88)	1	1 % Casein	0,032
Biotin (1:44)	1	1 % Casein	0,035
Biotin (1:88)	1	0,02 % SSA ¹	0,035
Biotin (1:88)	1	1 % Casein/ 0,5 % Tween	0,085
Biotin (1:44)	1	1 % Casein/ 0,5 % Tween	0,091
Biotin (1:88)	1	1 % Casein/ 0,25 % Tween	0,121
Biotin (1:88)	1	1 % Casein/ 0,125 % Tween	0,111
Biotin (1:88)	1	0,02 % SSA / 0,25 % Tween	0,161
Biotin (1:88)	1	0,02 % SSA / 0,125 % Tween	0,153
Biotin (1:88)	2	1 % Casein	0,065
Biotin (1:88)	2	1 % Casein/ 0,5 % Tween	0,135
Biotin (1:44)	2	1 % Casein/ 0,5 % Tween	0,188
Biotin (1:88)	4	1 % Casein	0,087
Digoxigenin (1:70)	2	1 % Casein/ 0,25 % Tween	0,1
Digoxigenin (1:35)	2	1 % Casein/ 0,25 % Tween	0,378
Digoxigenin (1:17,5)	2	1 % Casein/ 0,25 % Tween	0,201

¹SSA = Serumalbumin vom Schaf

3.2.3.3 Nachweis von *Francisella tularensis*

Bei diesem Nachweis standen neben dem, gegen das Lipopolysaccharid gerichteten monoklonalen Antikörper FF 11/6/1, noch zwei verschiedene polyklonale Kaninchenantiseren gegen *Francisella tularensis* zur Verfügung. Diese erwiesen sich aber in orientierenden Versuchen aufgrund ihrer geringen Reaktivität als ungeeignet (Abb. 8). Auch bei diesem Nachweis resultierten die im Rahmen der Optimierungsstrategie überprüften Modifikationen der Testdurchführung in einer deutlichen Verbesserung der Testsensitivität. Bei der Biotinylierung dieses mAk wurden alle vier oben beschriebenen Varianten (1:88, 1:44, 1:22, 1:11) durchgeführt, da die Aktivität des markierten Antikörpers in Abhängigkeit vom Grad der Biotinylierung ein untypisches Verhalten aufwies und stark variierte – je niedriger das molare Kopplungsverhältnis zwischen mAk und Biotin, desto höhere immunologische Aktivität im Sandwich-EIA (Abb. 9).

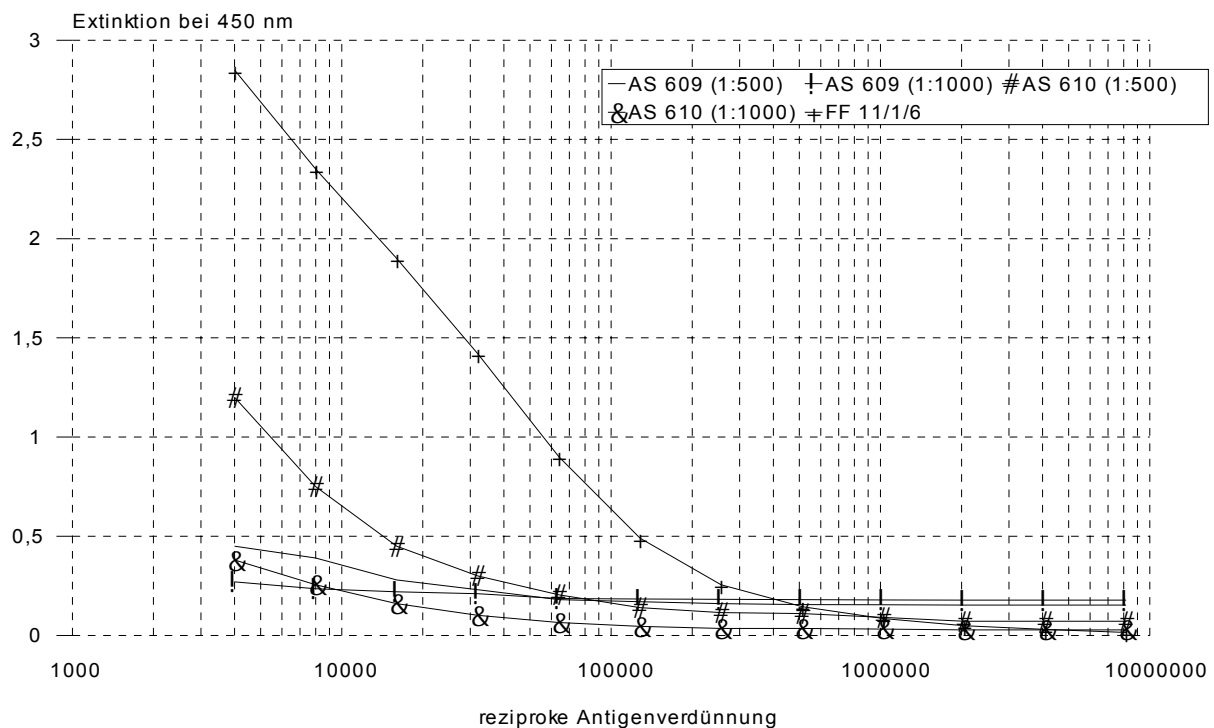


Abbildung 8: Verwendung unterschiedlicher Beschichtungsantikörper (polyklonale Kaninchenseren bzw. mAk FF11/1/6) zum Nachweis von *F. tularensis* im Sandwich-EIA. Als Detektionsantikörper wurde biotinylierter (1:11) mAk F11/1/6 (1 µg/ml) verwendet

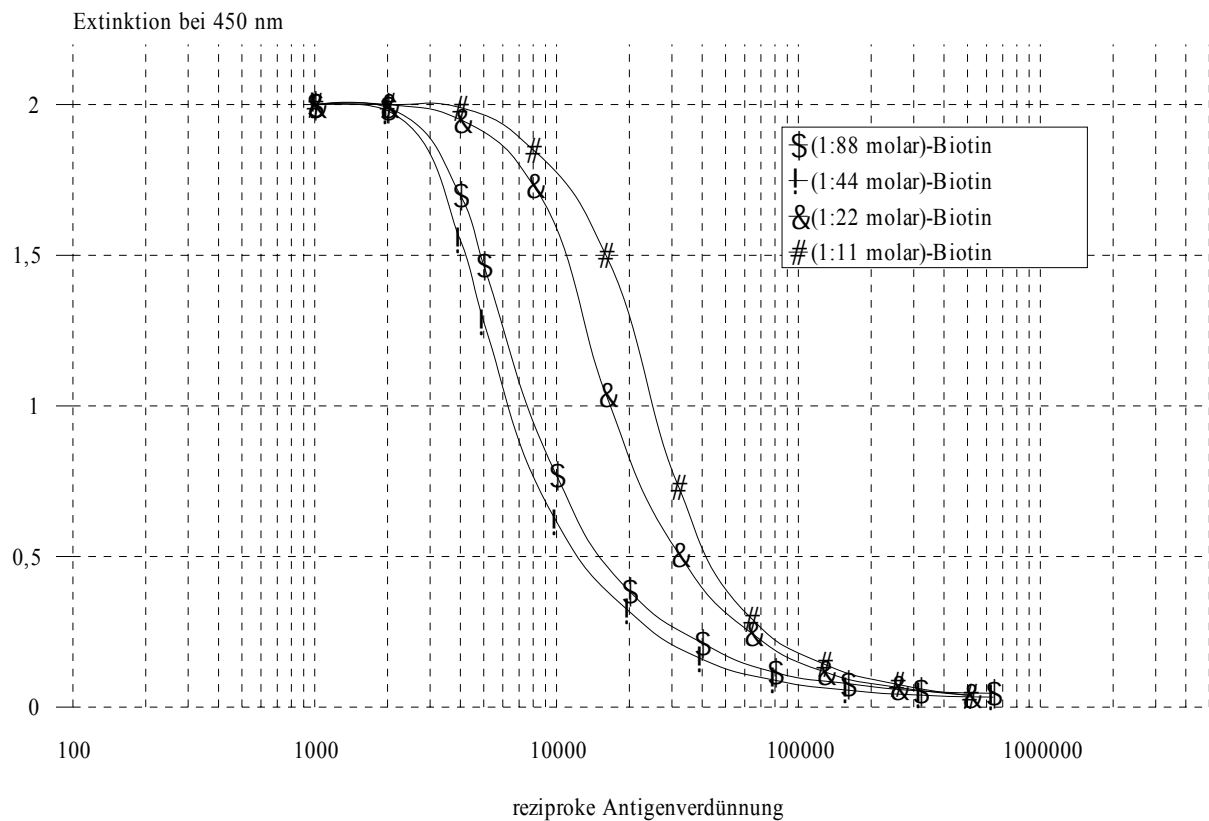


Abbildung 9: Vergleich der Standardkurven einer inaktivierten *Francisella tularensis* Antigenpräparation bei Verwendung von unterschiedlich biotinylierten Nachweisantikörpern (Einsatzkonzentration = 2 µg/ml)

Eine weitere unerwartet hohe Steigerung der Sensitivität konnte durch die Markierung des Nachweisantikörpers mit Digoxigenin, vor allem mit der 1:17,5 molar gekoppelten Variante, erreicht werden. Die Extinktionswerte der antigenfreien Kontrollansätze lagen durchwegs auf sehr niedrigem Niveau (0,007 – 0,02), auch wenn sehr hohe Konzentrationen (8 µg/ml) des 1:11 biotinylierten mAk eingesetzt wurden (Tab. 5). Im Hinblick auf den hohen Materialverbrauch und potentiellen Backgroundproblemen im Multi-Analyt-System wurde der Nachweisantikörper jedoch standardmäßig in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet.

Der zuvor beobachtete positive Effekt eines Detergenzien-Zusatzes zur Antigen-Verdünnungslösung wurde auch in diesem Testsystem beobachtet. Der Zusatz von Tween 20 zur Nachweisantikörper-Verdünnungslösung hatte hingegen in diesem Testsystem nur einen geringen Effekt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tabelle 5: Übersicht über die Testcharakteristika verschiedener Sandwich-EIA Varianten zum Nachweis von *F. tularensis*

Markierung (molares Verhältnis)	Konzentration (µg/ml)	Nachweisgrenze (KbE/ml)	Extinktion des antigenfreien Kontrollwert
Biotin (1:88)	2	1×10^5	0,047
Biotin (1:44)	2	4×10^4	0,03
Biotin (1:22)	2	3×10^4	0,030
Biotin (1:11)	0,5	8×10^5	0,015
Biotin (1:11	1	4×10^4	0,020
Biotin (1:11	2	4×10^3	0,02
Biotin (1:11	4	3×10^3	0,030
Biotin (1:11	8	2×10^3	0,035
Digoxigenin (1:35)	2	8×10^3	0,017
Digoxigenin (1:17,5)	2	1×10^3	0,020

Wie auch beim *Y. pestis* Nachweis standen zur Überprüfung der Inaktivierungsmethoden des Erregers drei unterschiedlich behandelte Präparationen von *F. tularensis* zur Verfügung. Die EIA-Reaktivität dieser auf eine optische Dichte (560 nm) von 1,0 (entspricht $2-4 \times 10^9$ KbE/ml) eingestellten Keimsuspensionen zeigten auch hier Unterschiede, wobei diese allerdings nicht so ausgeprägt waren wie beim *Y. pestis*-Nachweis. Durch Hitzeinaktivierung des Erregers wurde die Nachweisbarkeit des LPS-Antigens am wenigsten beeinflusst. Unter Berücksichtigung des oben erwähnten Ausgangskeimgehaltes ergab sich für diese Präparation bei Einsatz des digoxigenierten Nachweisantikörpers eine rechnerische Nachweisgrenze von $1 \times 10^3 \pm 5 \times 10^2$ KbE/ml (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht über die Nachweisbarkeit von verschiedenen inaktivierten Antigenpräparationen von *F. tularensis*

Inaktivierungsverfahren	Nachweisgrenze (KbE/ml)	Extinktion des antigenfreien Kontrollwert
Hitze	1×10^3	0,035
7,4 % Formaldehyd	1×10^4	0,095
50 % Isopropanol	5×10^4	0,077

Zur besseren Übersicht sind in Tab. 7 nochmals einige Testcharakteristika der verschiedenen EIA-Sandwich-Varianten zum Nachweis von Yersinien, Francisellen und Coxiellen zusammengefasst, wobei im Hinblick auf die geringere Streubreite von Daten aus dem linearen Kurvenbereich Extinktionswerte von 1,0 zum Sensitivitätsvergleich herangezogen wurden. Bei allen Varianten wurden die für den Einzelnachweis optimierten EIA-Parameter berücksichtigt. Für den Nachweis von *F. tularensis* wie auch von *Y. pestis* sind die Vorteile Digoxigenin-Systems offensichtlich, während beim *C. burnetii*-Nachweis bedingt durch die niedrigeren Extinktionswerte des antigenfreien Kontrollansatzes der Einsatz von biotinylierten Antikörper-Konjugaten sich als günstiger erwies. Des Weiteren zeigte sich, dass die Markierungsdichte des Nachweisantikörpers einen ausgeprägten Einfluss auf die Sensitivität des immunchemischen Nachweissystems hat. Die für die Antikörpermarkierung zu verwendenden Hapten-Konzentrationen müssen jedoch für die jeweiligen mAk empirisch ermittelt werden, da hierbei ausgeprägte individuelle Unterschiede bestehen.

Tabelle 7: Vergleich der Reaktivität der verschiedenen Antikörper-Konjugate zum Nachweis von Bakterien. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze sind jeweils diejenigen Antigenkonzentrationen (Antigenzusatz +) aufgeführt, die bei Einsatz in den entsprechenden EIA's eine Extinktion von 1.0 hervorriefen. Die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (Antigenzusatz -) wurde bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Kopplungs- ansatz	Antigen- zusatz	Nachweisverfahren		
		<i>Y. pestis</i> (KbE/ml)	<i>C. burnetii</i> (Part./ml)	<i>F. tularensis</i> (KbE/ml)
Markierung mit Biotin (molares Kopplungsverhältnis)				
(1:88)	+	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶
	-	0,035	0,090	0,045
(1:44)	+	2 x 10 ⁶	7 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶
	-	0,025	0,177	0,042
(1:22)	+	1,5 x 10 ⁶	n. d.	1 x 10 ⁶
	-	0,028	n. d.	0,043
(1:11)	+	n. d.	n. d.	6 x 10 ⁵
	-	n. d.	n. d.	0,020
Markierung mit Digoxigenin (molares Kopplungsverhältnis)				
(1:70)	+	6 x 10 ⁴	3 x 10 ⁶	n. d.
	-	0,046	0,100	n. d.
(1: 35)	+	4 x 10 ⁴	5 x 10 ⁵	6 x 10 ⁴
	-	0,040	0,370	0,020
(1:17,5)	+	4 x 10 ⁴	3 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵
	-	0,037	0,210	0,020

n. d. = nicht durchgeführt

3.2.3.4 Nachweis von Shiga-like Toxin 1 (Stx 1)

Für die Etablierung dieses Nachweissystems standen zwei verschiedene Antikörper (13C4 bzw. 2H3) zur Verfügung, die mit hoher Affinität an die B-Untereinheit des Stx 1 Toxins binden. Aufgrund der AB₅-Struktur des Toxins war es auch möglich, nur auf einem mAk basierende Sandwich-EIA Varianten zu erstellen. Hierbei erwies sich das System, in dem der mAk 13C4 (STOCKBINE et al., 1985) sowohl als Beschichtungs- wie auch als Detektionsantikörper eingesetzt wurde, als besonders empfindlich (Abb. 10). Auch bei Verwendung des mAk 2H3 (KEIL, 1999) als Fangantikörper konnte in Kombination mit biotinylierten mAk 13C4 eine vergleichbare Sensitivität erzielt werden. EIA-Versuche, bei denen biotinylierte 2H3 als Nachweisantikörper dienten, wiesen dagegen eine deutlich geringere Testempfindlichkeit auf.

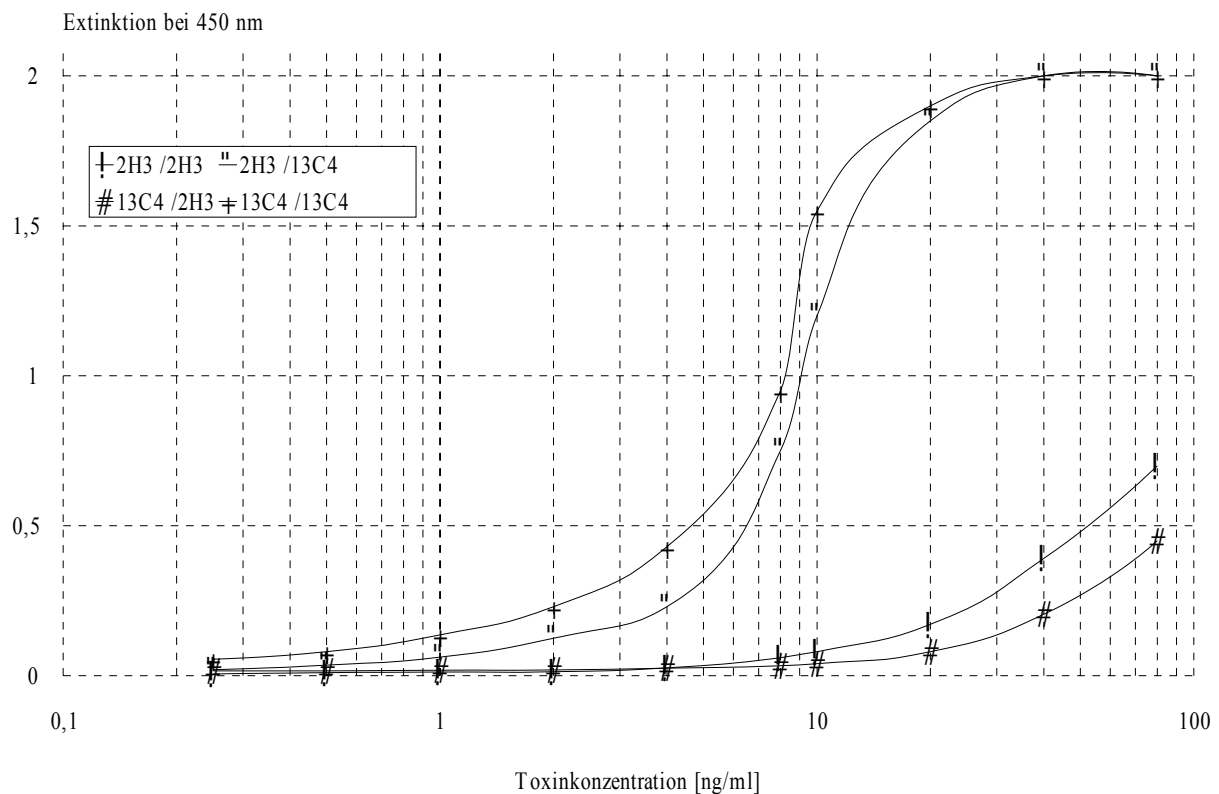


Abbildung 10: Sensitivität verschiedener Sandwich-EIA's zum Nachweis von Stx 1: die zur Verfügung stehenden mAk's (2H3 bzw. 13C4) wurden jeweils als Fangantikörper (10 µg/ml) bzw. als biotinylierte (1:88) Detektionsantikörper (2 µg/ml) eingesetzt.

Die Digoxigenierung der Antikörper erwies sich beim Stx 1-Nachweis in Vergleich zur Biotinylierung als die deutlich bessere Alternative. Beim Vergleich des digoxigenierten mit dem biotinylierten mAk 13C4 wurde eine sehr hohe Sensitivitätssteigerung um etwa Faktor 10 festgestellt, wobei es zwischen den digoxigenierten Varianten 1:35 molar und 1:17,5 molar nur geringe Unterschiede gab. Alle anderen überprüften Testmodifikationen (unterschiedliche Konzentration des Detektionsantikörpers, Tween20-Zusätze zu den Verdünnungslösungen) hatten hingegen nur einen relativ geringen Einfluss auf den Verlauf der Standardkurven. Die Nachweisgrenze für gereinigtes, rekombinantes Stx 1 lag bei 0,2 ng/ml (biotinylierter Antikörper) bzw. bei 35 pg/ml (digoxigenerter Antikörper). Diese zur Bestimmung der Testsensitivität verwendete, kommerziell erhältliche Stx 1 erwies sich jedoch als sehr instabil, so dass im weiteren Verlauf der Arbeit eine selbst hergestellte Toxoid-Präparation als Antigen eingesetzt wurde.

Dazu wurde der *E. coli* Stamm O22:H8 bv 1 (C 600 J1, Stx 1-Produzent) auf Schafblutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Für die Voranreicherung der Keime wurde Trypton-Soja-Bouillon (TSB) beimpft und für 20-24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Anzucht erfolgte in TSB mit Zusatz von Mitomycin C für weitere 24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad. Danach wurde die Anzucht abzentrifugiert, der Überstand entnommen und erneut zentrifugiert. Um auch das intrazellulär vorliegende Shigatoxin zu extrahieren, wurde das so gewonnene Zellpellet in PBS mit Zusatz von Polymyxin B Sulfat gelöst, für 30 min bei 37°C inkubiert und zentrifugiert (3000 xg; 20 min.). Anschließend wurde der Polymyxin-Extrakt und der Kulturüberstand vereinigt, sterilfiltriert, und durch Zusatz von kristallinem Ammoniumsulfat (58 g/100 ml) gefällt. Das entstandene Proteinpellet wurde danach in PBS-Puffer resuspendiert und gegen 3 x 5 l PBS (pH 7,2) dialysiert. Zur Herstellung der Toxoide wurden schließlich die beiden Toxin-Präparationen mit Formaldehyd (Endkonzentration 0,74 %) versetzt, für 7 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend gegen 3 x 5 l PBS dialysiert. Die Atoxizität dieser Präparationen wurde im Zytotoxizitätstest unter Verwendung von Verozellen überprüft.

Die Endpunkttiter dieser Toxoidpräparation lagen bei dem Biotin-Extravidin-System bei 1:1280 +/- 157, im Digoxigenin-System bei 1:16750 +/- 3947 (Abb. 11).

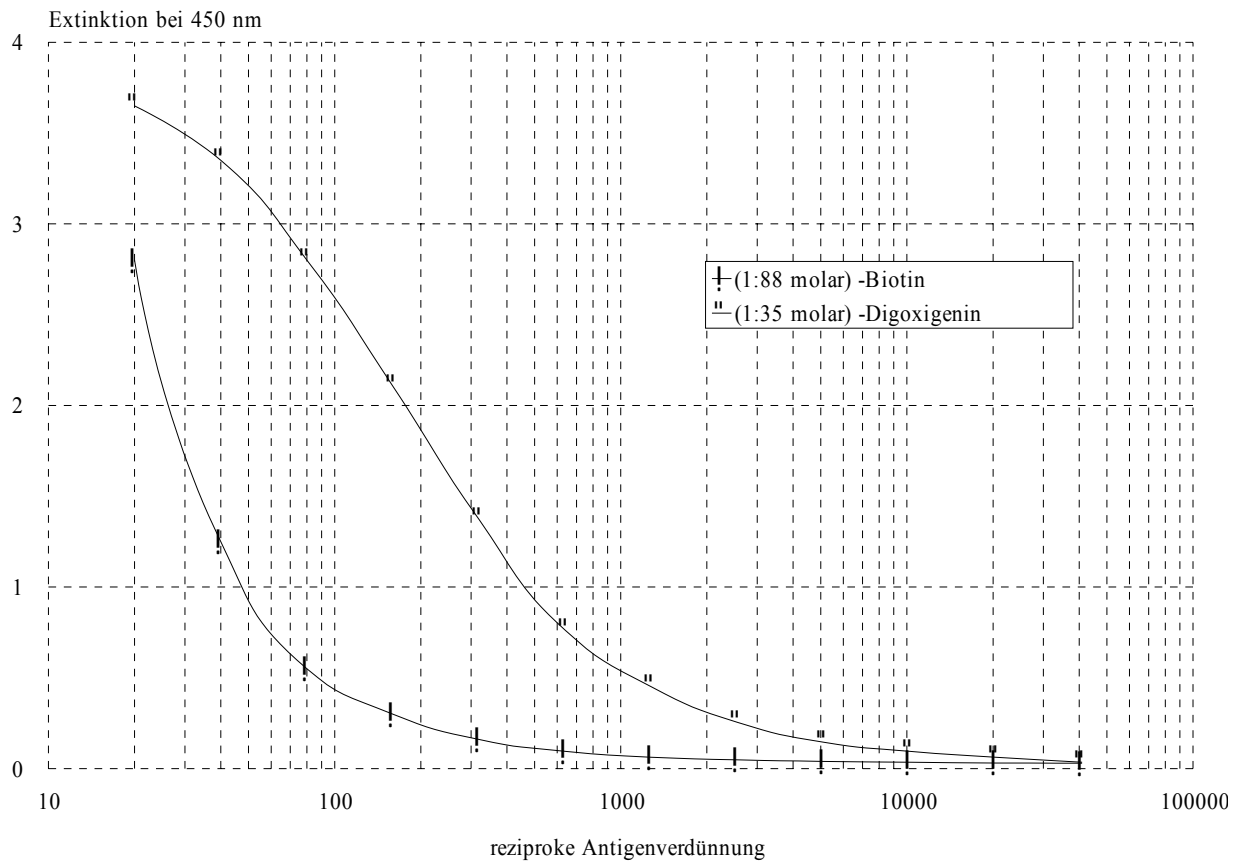


Abbildung 11: Standardkurven des Stx1-Toxoids im Sandwich-EIA bei Einsatz von biotinylierten bzw. digoxigenierten MAk 13C4 (2 µg/ml)

3.2.3.5 Nachweis von Shiga-(like) Toxin 2 (Stx 2)

Auch für den Nachweis von Stx 2 standen zwei verschiedene Antikörper (mAk 1E1 bzw. 1B5) zur Verfügung, die mit hoher Affinität an unterschiedliche Epitope des Toxins binden (KEIL, 1999). Zur Erstellung eines Sandwich-EIA's wurden verschiedene Kombinationen der Antikörper überprüft, wobei eine selbst hergestellte Toxoidpräparation als Antigen verwendet wurde. Die Herstellung der Präparation erfolgte wie in 3.2.3.4 beschrieben, bei der Anzucht wurde aber der *E. coli*-Stamm C600 W34, ein reiner Stx 2 Produzent, eingesetzt.

Bei der empfindlichsten Kombination diente mAk 1E1 (bindet an die A-Untereinheit des Toxins) als Fangantikörper, bzw. mAk 1B5 (reagiert sowohl mit der A als auch mit der B-Untereinheit des Toxins), als Detektionsantikörper. Desweiteren stand noch aus früheren Untersuchungen ein peroxidasemarkierter mAk 1B5 zur Verfügung, anhand dessen die Verbesserung der Testempfindlichkeit infolge der Verwendung haptenmarkierter Nachweisantikörper dokumentiert werden konnte.

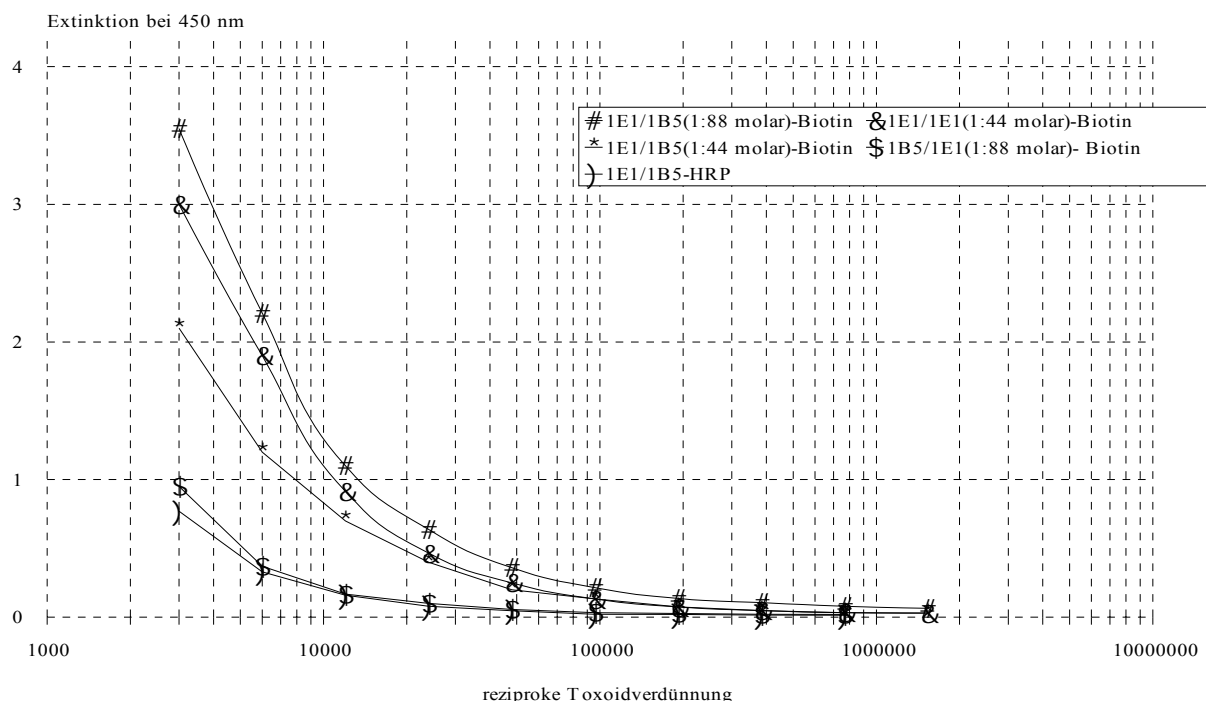


Abbildung 12: Standardkurven einer Stx 2-Toxoidpräparation: Vergleich verschiedener Kombinationen von Beschichtungs- und Nachweisantikörpern (Konzentration jeweils 1 µg/ml bzw. Verdünnung des 1B5-HRP 1:500)

So resultierte die Umstellung des EIA auf das Biotin/Extravidin-System in einer etwa um Faktor 10 verbesserten Nachweisgrenze, wobei der Kopplungsansatz mit dem höchsten Überschuss an Biotin (88:1) die besten Ergebnisse lieferte (Abb.12). Die Digoxigeninierung des mAk hatte nochmals eine ausgeprägte Sensitivitätssteigerung zur Folge (Abb. 13), zwischen den unterschiedlichen Kopplungsvarianten (1:35 bzw. 1:17,5) zeigten sich jedoch nur geringe Unterschiede.

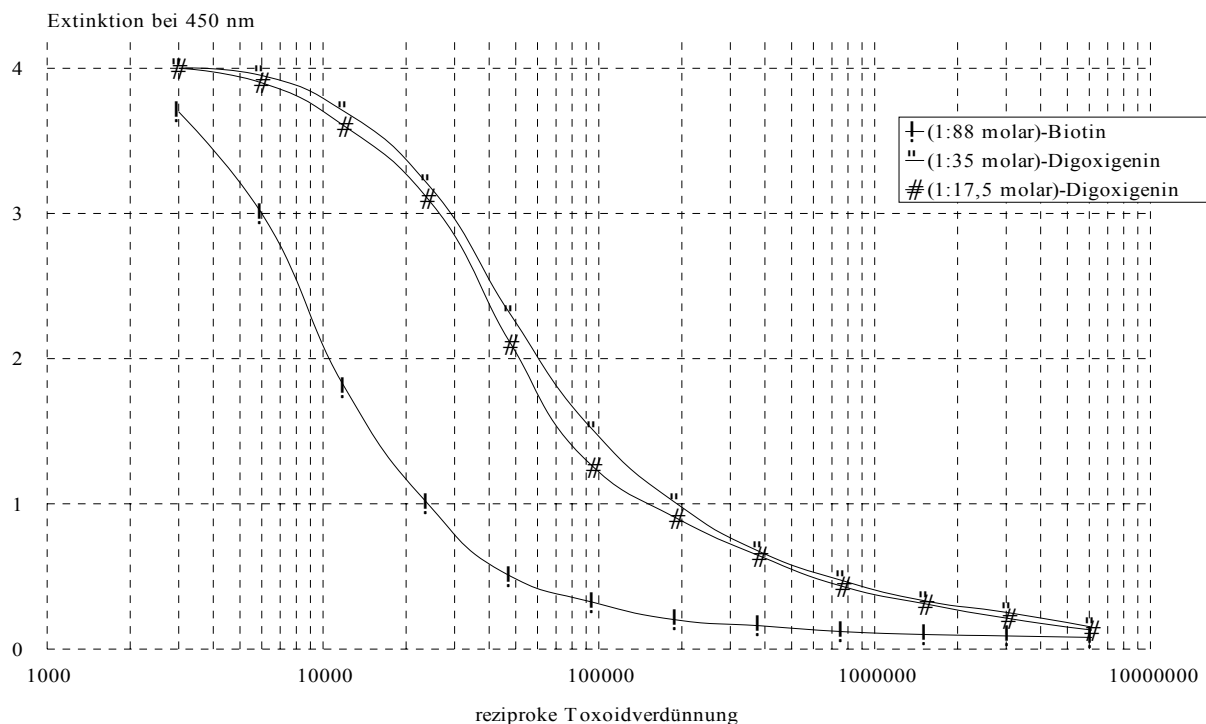


Abbildung 13: Nachweis einer Stx 2-Toxoidpräparation im Sandwich-EIA mit unterschiedlich markierten Detektionsantikörpern (jeweils mAk 1B5 in einer Konzentration von 1 µg/ml)

Die im Weiteren überprüften Testmodifikationen zeigten, wie auch beim Stx1-Nachweis, nur einen marginalen Einfluss auf die wesentlichen Testparameter. Das als Antigen eingesetzte Stx 2-Toxoid ließ sich mit dem optimierten Biotin/Extravidin-System noch in einer Verdünnung von $1:5 \times 10^5$ bzw. mit dem Digoxigenin-System noch bei $1:2 \times 10^6$ nachweisen. Für den klassischen auf Peroxidase-markierten Detektionsantikörpern basierenden Sandwich-EIA lag der Endpunkttiter hingegen nur bei $1:2 \times 10^4$.

3.2.3.6 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

Aufgrund der deutlich besseren Affinität wurde für die Erstellung dieses Testsystems auf affinitätschromatographisch gereinigte, polyklonale Antikörper (pAk) vom Schaf zurückgegriffen, die im Rahmen früherer Projekte hergestellt worden waren.

Die Biotinylierung des pAk in den beiden durchgeführten Varianten (1:88 und 1:44) resultierte in einer vergleichbaren Sensitivität, jedoch zeigte die stärker biotinylierte Variante eine Tendenz zu unspezifischen Anlagerungen, so dass die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes um etwa Faktor 2 höher lag als beim Vergleichsansatz. Die im Rahmen der Optimierungsstrategie überprüften Tween-20 Zusätze zu den Antigen- bzw. Antikörper-Verdünnungslösungen erwiesen sich bei diesem Testsystem in zweierlei Hinsicht als vorteilhaft. Zum einen wurde dadurch wie auch bei den meisten anderen

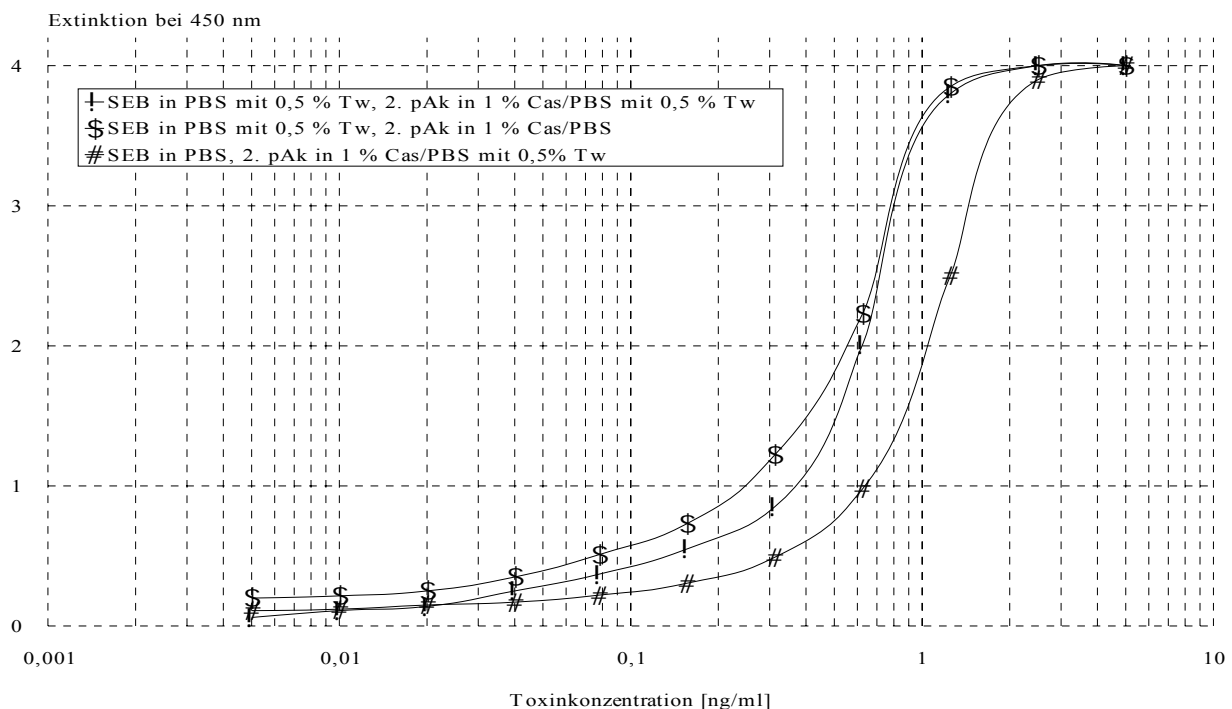


Abbildung 14: Sandwich-EIA zum Nachweis von SEB: Einfluss von Tween20 Zusätzen zu den Verdünnungslösungen auf den Verlauf der Standardkurven, der biotinylierte (1:44) Nachweisantikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt

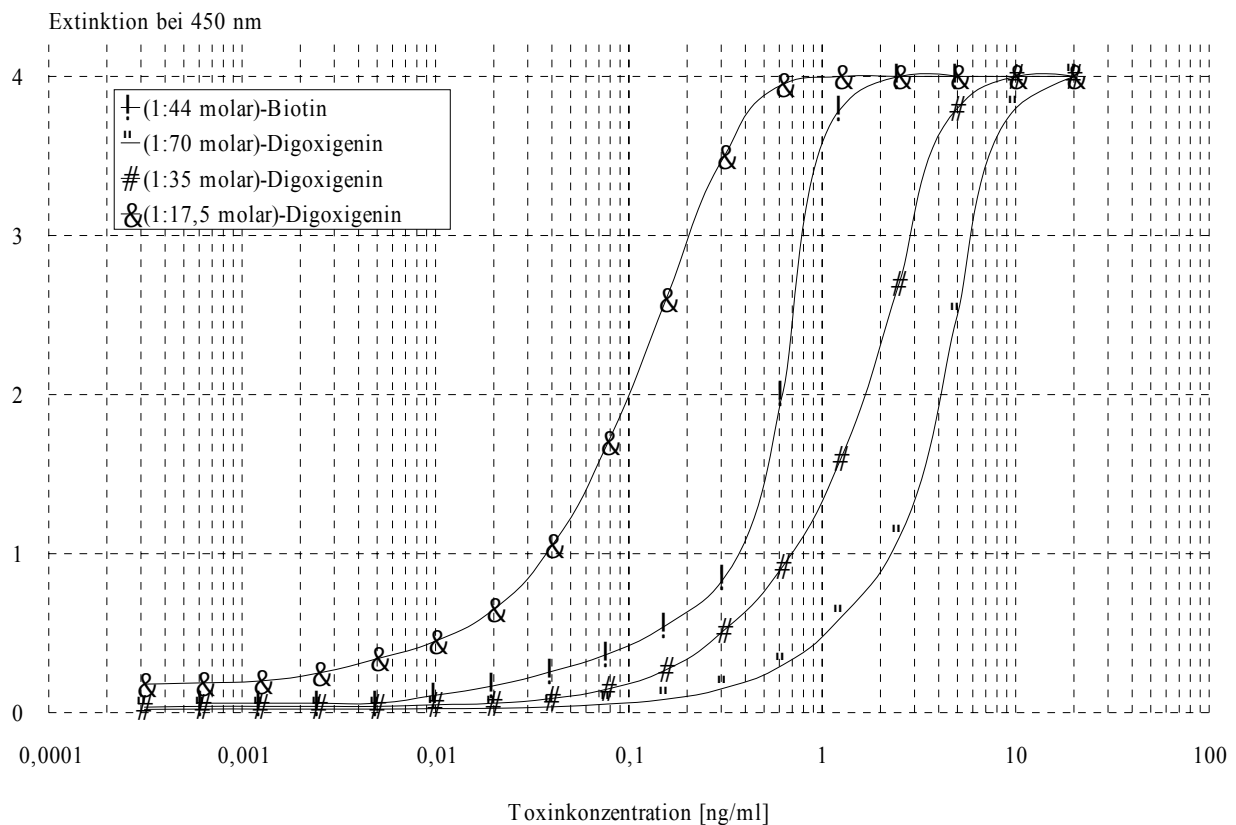


Abbildung 15: Vergleich der Standardkurven im Sandwich-EIA zum Nachweis von SEB bei unterschiedlich markiertem Detektionsantikörper.

Nachweisen eine deutliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit induziert, zum anderen konnten durch das Detergens im Biotin/ExtrAvidin System die anfänglich problematischen Leerwert-Extinktionen deutlich von durchschnittlich 0,2 auf 0,08 gesenkt werden (Abb. 14). Trotz dieser Modifikation des Testablaufs wurden aber bei der Implementierung digoxigener Detektionsantikörper wiederum vergleichsweise hohe Background-Extinktionen von durchschnittlich 0,21 beobachtet. Ohne Tween-Zusatz lagen die Werte allerdings noch höher (0,5 – 0,7).

Insbesondere mit den im Verhältnis 1:17,5 digoxigener Detektionsantikörpern konnte ein hochempfindliches Testsystem (Nachweisgrenze 5-20 pg/ml) etabliert werden (Abb. 15). Aber auch die Nachweisgrenze des Biotin/ExtrAvidin Systems lag mit 30 pg/ml deutlich niedriger als die eines am Institut etablierten und auf peroxidase markierten Antikörper basierenden klassischen Sandwich-EIA's (100 pg/ml).

Tabelle 8 gibt anhand verschiedener Testkriterien eine Übersicht zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisierten Sandwich-EIA's für mikrobielle Toxine (Stx 1, Stx 2, SEB). Prinzipiell konnten auch hier die bei den bakteriellen Nachweisen gemachten Erfahrungen bestätigt werden: (1) bei allen Nachweisen erwies sich das Digoxigenin dem Biotin/ExtrAvidin-System als überlegen und (2) im Hinblick auf den optimalen Kopplungsansatz ließ sich weder bei der Biotinylierung noch bei der Digoxigenierung eine eindeutige Tendenz erkennen.

Tabelle 8: Vergleich der Reaktivität der verschiedenen Antikörper-Konjugate zum Nachweis von bakteriellen Toxinen. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze sind jeweils diejenigen Antigenkonzentrationen (Antigenzusatz +) aufgeführt, die bei Einsatz in den entsprechenden EIA's eine Extinktion von 1.0 hervorriefen. Die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes (Antigenzusatz -) wurde bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Nachweis- Antikörper	Antigen- zusatz	Nachweis von		
		Stx 1 ¹	Stx 2 ²	SEB
Markierung mit Biotin (molares Kopplungsverhältnis)				
(1:88)	+	1:51	1: 2 x 10 ⁴	0,6 ng/ml
	-	0,025	0,05	0,12
(1:44)	+	1:42	1:7 x 10 ³	0,4 ng/ml
	-	0,02	0,03	0,06
(1:22)	+	1:36	n. d.	n. d.
	-	0,02	n. d.	n. d.
(1:11)	+	n. d.	n. d.	n. d.
	-	n. d.	n. d.	n. d.
Markierung mit Digoxigenin (molares Kopplungsverhältnis)				
(1:70)	+	1:6	1:1 x 10 ⁴	2,5 ng/ml
	-	0,02	0,3	0,033
(1: 35)	+	1:490	1:3 x 10 ⁵	0,6 ng/ml
	-	0,034	0,08	0,055
(1:17,5)	+	1:484	1:2 x 10 ⁵	0,04 ng/ml
	-	0,03	0,1	0,155

n. d. = nicht durchgeführt

¹ Verdünnung eines formalininaktivierten Toxins von *E. coli* C600 J1

² Verdünnung eines formalininaktivierten Toxins von *E. coli* C600 W34

3.2.3.7 Nachweis von Orthopox-Virus

Als Immunreagenzien standen ein monoklonaler Antikörper (Anti-Vaccinavirus 5B1) und ein vom IMB hergestelltes Kaninchen-Hyperimmunserum (rb-anti-vacc.) zu Verfügung. Beide Antikörper wurden in biotinylierten Varianten (molares Kopplungsverhältnis 1:88 bzw. 1:44) hergestellt und im Mikrotiterplattenformat in Hinblick auf die Parameter Sensitivität und unspezifischer Hintergrund getestet. Nach Biotinylierung der Antikörper resultierten grundsätzlich alle Kombinationen, bei denen das polyklonale Antiserum gemeinsam mit dem monoklonalen Antikörper verwendet wurde, in einer inakzeptablen hohen Steigerung der Extinktionen des antigenfreien Kontrollansatzes auf Werte von $\geq 0,5$, während die nur auf dem monoklonalen Antikörper basierende Anordnung nur eine vergleichsweise niedrige Sensitivität aufwies (Abb. 16)

Bei Kombination des rb-anti-vacc-Antikörpers mit biotinyliertem rb-anti-vacc konnte hingegen eine Nachweisgrenze von 5×10^3 PbE/ml bei einem relativ niedrigen antigenfreien Kontrollwert erreicht werden (Abb. 17). Beim Transfer dieser Testanordnung auf das Multi-Analyt-System (3.2.3.9) traten jedoch extrem hohe unspezifische Kreuzreaktionen mit den anderen Nachweisantikörpern auf. Auch andere Testanordnungen, in denen das Hyperimmunserum verwendet wurde, führten zu identischen Ergebnissen, so dass im weiteren Verlauf dieser Arbeit diese hochsensitive Variante nicht mehr eingesetzt werden konnte.

Die Sensitivität des exklusiv auf den mAk basierenden Tests konnte durch die Umstellung auf das Digoxigenin-System deutlich verbessert werden (Abb. 17), wobei sich insbesondere die im molaren Verhältnis von 1:35 mAk gekoppelte Variante bewährte. Der Zusatz von Tween 20 zu den Verdünnungslösungen von Antigen und Antikörper bewirkte keine Steigerung der Sensitivität, aber das Testsystem zeigte insgesamt eine höhere Reproduzierbarkeit.

Die Antigenpräparation aus einem Cowpox Brighten Gemisch vom Institut für Mikrobiologie, München, reagierte noch in einer Verdünnung mit 1×10^4 PbE/ml positiv (Tab. 9).

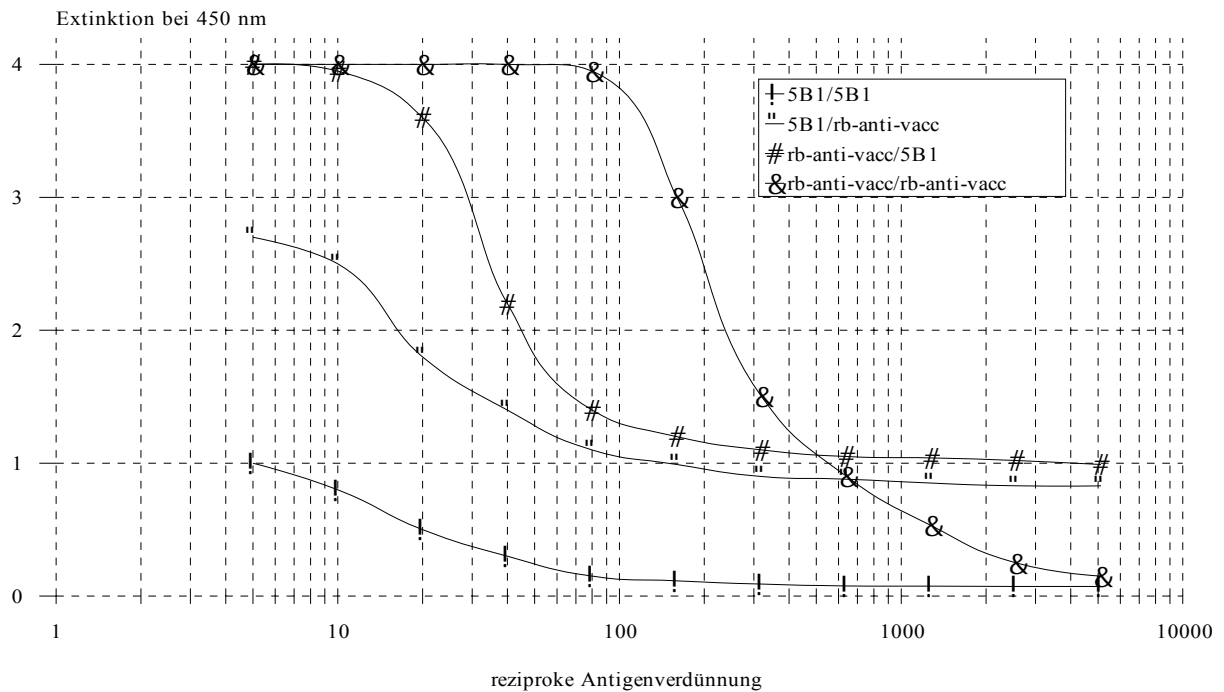


Abbildung 16: Vergleich der Beschichtungs- und Nachweisantikörper-Kombinationen im Sandwich-EIA zum Nachweis von Orthopoxvirus (biotinylierte Nachweisantikörper in Konzentrationen von $2\mu\text{g/ml}$ 1 % Casein/PBS mit 0,3 % Tween 20 eingesetzt).

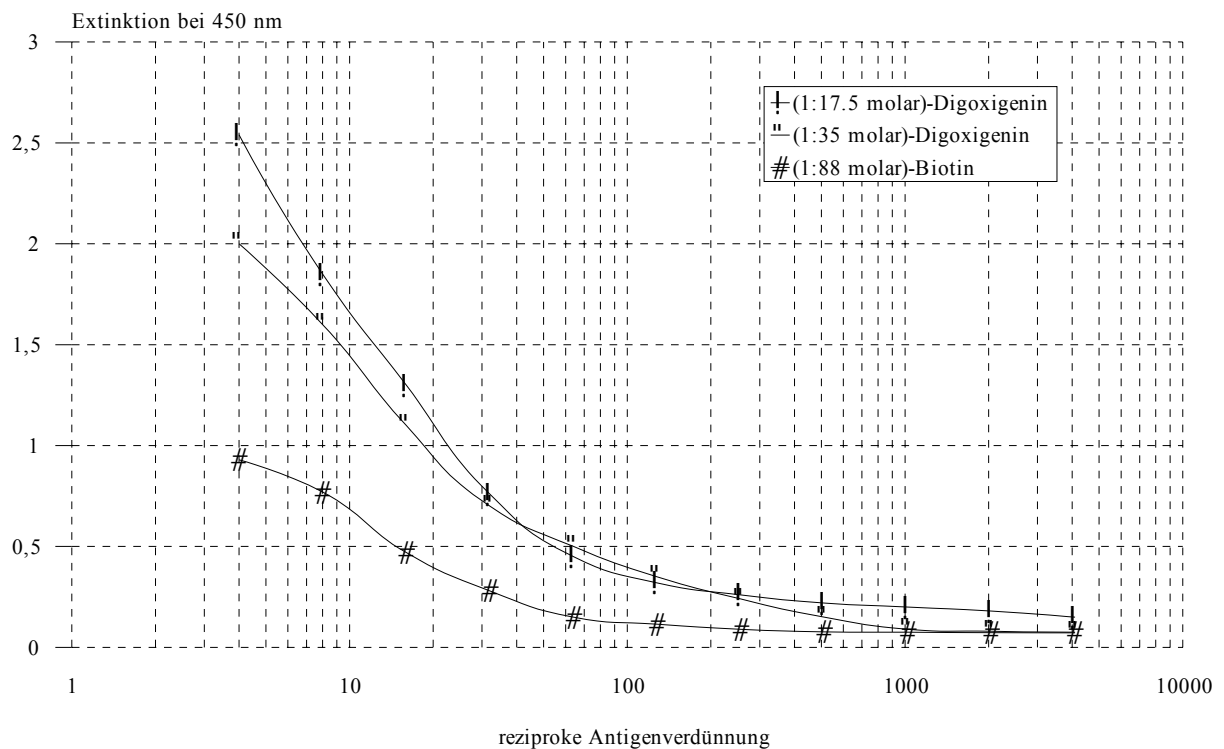


Abbildung 17: Vergleich der Standardkurven im Sandwich-EIA zum Nachweis von Orthopoxvirus bei Verwendung unterschiedlich markierter Nachweisantikörper (mAk 5B1 in Konzentrationen von $2\mu\text{g/ml}$)

Tabelle 9: *Testcharakteristika der Sandwich-ELIA's zum Nachweis von Orthopox-Virus. Als Beschichtungsantikörper wurde mAk 5B1 verwendet, das Antigen in PBS mit 0,5 %, Tween 20, die Nachweisantikörper in 1 % Casein/PBS verdünnt.*

Nachweisantikörper (2µg/ml)	Nachweisgrenze (PbE/ml)	Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes
Kan.- α –vacc. (1:88 molar)-Biotin	2×10^5	0,434
Kan.- α –vacc. (1:44 molar)-Biotin	3×10^5	0,55
5B1 (1:88 molar)-Biotin	$1,3 \times 10^5$	0,05
5B1 (1:44 molar)-Biotin	2×10^5	0,033
5B1 (1:35 molar)-Digoxigenin	1×10^4	0,07
5B1 (1:17,5 molar)- Digoxigenin	2×10^4	0,182

3.2.3.8 Alternative Detektionsverfahren

3.2.3.8.1 Chemilumineszenz

Neben der Erstellung klassischer auf Absorptionsmessung beruhender EIA-Verfahren, wurde in orientierenden Untersuchungen überprüft, ob durch den Einsatz chemilumineszierender Substrate eine weitere Steigerung der Nachweisempfindlichkeit der Testverfahren möglich ist. Da nach Adaption der Tests auf ein Microarray-Format ebenfalls die Chemilumineszenz als Detektionsmethode eingesetzt werden sollte, ermöglichten diese im folgenden beschriebenen Versuche auch einen direkten Vergleich der beiden EIA-Formate (Mikrotiterplatte bzw. Microarray).

Die Sandwich-EIA's bei denen chemilumineszierende Substrate verwendet wurden, wurden in weißen Mikrotiterplatten unter den für die Einzelnachweise (3.2.3.1-3.2.3.7) optimierten Testbedingungen durchgeführt. Vorversuche zeigten, daß die Verwendung des Substrats SuperSignalFemto in deutlich höheren Signalintensitäten resultierte als die alternativ überprüften SuperSignalPico bzw. BM chemiluminescence ELISA bzw. Chemilumineszenz Detektion Kit (Abb. 18). Die Messung erfolgte mittels Multilabelcounter Viktor³, die Meßdauer betrug 1 s/Kavität.

Die Ergebnisse sind in Tab. 11 vergleichend mit den anderen überprüften Detektionsverfahren (Absorption bzw. Fluoreszenz) dargestellt. Prinzipiell konnte durch den Einsatz des chemilumineszierenden Substrates im Vergleich zum chromogenen Substrat nur noch eine geringfügige Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden. Dies ist v. a. darauf zurückzuführen, das unter den verwendeten Testbedingungen bei den antigenfreien Kontrollansätzen relativ hohe und vergleichsweise stark variierende Signalintensitäten auftraten. Diese Variationsbreite der Einzelmeßdaten führte bei der Berechnung der Nachweishgrenzen (definiert als Mittelwert der Einzelmessungen + dreimal Standardabweichung) zu einer deutlichen Verschiebung des ausschlaggebenden Schwellenwertes.

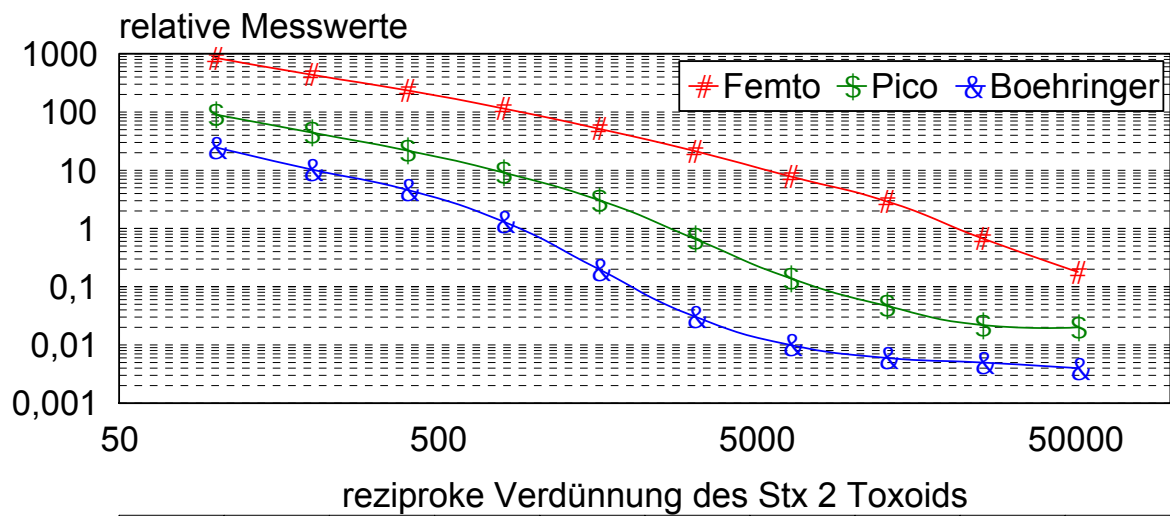


Abbildung 18: Einsatz verschiedener chemilumineszierender Meerrettichperoxidase-Substrate in einen Sandwich-EIA zum Nachweis von Stx 2. Als Nachweisantikörper wurde peroxidasemarkierter MAK 1B5 verwendet, als Antigen eine Stx2 Toxoid-Präparation.

Femto: Super Signal ELISA Femto Substrat (Pierce Chem. Comp.)

Pico: Super Signal ELISA Pico (Pierce Chem. Comp.)

Boehringer: BM chemiluminescence ELISA substrate (Roche Diagnostics)

3.2.3.8.2 Fluoreszenz

Ebenfalls im Hinblick auf die Adaptation der Nachweisverfahren an das Microarray-Format, wurden die in den jeweiligen Einzeltests verwendeten Nachweisantikörper (3.2.3.1-3.2.3.7) auch mit fluoreszierenden Farbstoffen (Alexa-488 bzw. Alexa-647) markiert (3.2.1.3). Die spektralen Eigenschaften des Alexa-488 entsprechen etwa denen des seit langem verwendeten Fluoresceins, allerdings weist diese Verbindung laut Herstellerangaben eine deutlich höhere Photostabilität auf. Alternativ dazu wurde Alexa-647, ein rotabsorbierendes Fluorochrom, zur Markierung der Antikörper verwendet. Aufgrund der niedrigeren Lichtstreuung und der geringen Autofluoreszenz von biologischen Proben im Wellenbereich von > 620 nm, werden solche Farbstoffe zunehmend in entsprechenden Nachweisverfahren eingesetzt, da durch den geringen auftretenden Background die maximal erreichbare Testsensitivität im Vergleich zu klassischen Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. FITC deutlich verbessert wird (BUSCHMANN et al., 2003).

Bei der Herstellung der Antikörper-Konjugate war zu berücksichtigen, dass es bei höheren Belegungsdichten zu einem Verlust der Fluoreszenz-Eigenschaften (Self-Quenching) durch Interaktionen mit aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan, kommen kann. Des Weiteren kann als Folge einer Überladung mit Fluorochromen eine ausgeprägte Inaktivierung des Antikörpers auftreten.

Die Reaktivität der mit den Fluorochromen markierten Antikörper konnte größtenteils in indirekten EIA's überprüft werden. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Antigenpräparationen in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) über Nacht beschichtet und anschließend freie Bindungsstellen mit 3 % Casein/PBS (150 μ l/Kavität) über eine halbe Stunde auf einem Taumler abgesättigt. Nach einem Waschschrift wurden parallel Verdünnungsreihen (1:2) der unbehandelten bzw. mit Alexa-Farbstoff markierten antigenspezifischen Antikörper aufgetragen (Ausgangskonzentration 10 μ g/ml in 1 % Casein/PBS; 100 μ l/Kavität) und für 1 h inkubiert. Gebundene, aktive Antikörper wurden dann durch Zugabe peroxidasemarkierter Sekundärantikörper (rb- α -ms-Ig-HRP bzw. rb- α -sh-Ig-HRP) nachgewiesen.

Anhand der Extinktionswerte des unbehandelten Antikörpers konnte im Vergleich zu denen der fluoreszenzmarkierten Präparationen die prozentuale Restaktivität der Antikörper nach der Kopplung ermittelt werden (Tab. 10). Die Kopplungsrate von Fluorochrom zu Antikörper wurde nach Herstellerangaben anhand der molaren Absorptionskoeffizienten photometrisch bestimmt. Bei den mit Alexa-647 markierten Antikörpern konnte zwar in Abhängigkeit von der Kopplungsdichte (3-7 Moleküle Farbstoff/Antikörper) eine teilweise Inaktivierung festgestellt werden, die gemessenen Restaktivitäten von 40-90 % lagen aber noch im für Antikörper-Konjugate üblichen Bereich. Auch die durch photometrische Messungen bestimmten Kopplungsraten lagen größtenteils in dem vom Hersteller der Fluorochrome empfohlenen Bereich von 3-6 Molekülen pro Antikörper.

Tabelle 10: Charakteristika der Fluorochrom-Antikörper-Konjugate

Nachweis- system	markierter Antikörper	Kopplungsrate		% Restaktivität	
		Alexa 488	Alexa 647	Alexa 488	Alexa 647
<i>Y. pestis</i>	G 20	3,9	4,7	104	87
<i>C. burnetii</i>	2F8	5,8	7,1	70	56
<i>F. tularensis</i>	FF 11/1/6	5,6	6,0	51	48
Stx 1	13C4	n.d.	5,2	-	53
Stx 2	1B5	n.d.	6,7	70	40
SEB	sh- α -SEB	5,9	3,9	87	97
Orthopox- viren	5B1	n.d.	6,0	-	n.b.

n. d. = nicht durchgeführt

n. b. = nicht bestimmbar

Basierend auf den in 3.2.3.1 - 3.2.3.7 beschriebenen Erfahrungen bei den Optimierungsstudien wurden für den Nachweis der Einzelsubstanzen auch fluoreszenzimmunologische Nachweisverfahren im Mikrotiterplatten-Format erstellt., wobei bei den mit Alexa-647 markierten Nachweisantikörper weiße und bei den Alexa-488 markierten schwarze Testtablets verwendet wurden. Die Durchführung des EIA erfolgte prinzipiell wie in 3.2.2 beschrieben, außer daß nach der Antigenzugabe die fluoreszenzmarkierten Antikörper (üblicherweise 10 µg/ml in 1 % Casein/PBS) zugegeben und für 1 h inkubiert wurden. Nach einem anschließenden Waschschrift wurde jede Kavität mit 100 µl PBS beschickt und die Platte unter folgenden Bedingungen vermessen:

Alexa-488: Exzitationsfilter 485 nm,
Emissionsfilter 535 nm,
Meßzeit 0,5 s/Kav.,
Meßhöhe 3 mm

Alexa-647: Exzitationsfilter 635 nm,
Emissionsfilter 680 nm,
Meßzeit 0,2 s/Kav.,
Meßhöhe 3 mm

Im Vergleich zu den beiden anderen auf Peroxidase basierenden Tests war prinzipiell bei dem fluoreszenzimmunologischen System eine deutliche Verschlechterung der Nachweisgrenzen um etwa den Faktor 100-1000 zu beobachten, obwohl die markierten Antikörper in einer deutlich höheren Konzentration (10 µg/ml) eingesetzt worden waren. Bedingt durch die geringere Autofluoreszenz im langwelligen, rotabsorbierenden Bereich zeichneten sich die auf Alexa-647 basierenden Systeme durch etwas bessere Testcharakteristika aus.

Die mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern erreichten Nachweisgrenzen sind in Tab. 11, vergleichend mit Chemilumineszenz und Absorption, dargestellt.

Tabelle 11: Vergleich der Testempfindlichkeit verschiedener EIA-Varianten im Mikrotiterplatten-Format. Zum Antigennachweis wurden biotinylierte (bioti.), digoxigenierte (digoxi.) bzw. fluoreszenzmarkierte Nachweisantikörper verwendet

Nachweis von	Nachweis- antikörper	Absorption		Chemilumineszenz		Fluoreszenz	
		bioti.	digoxi.	bioti.	digoxi.	Alexa-488	Alexa-647
<i>Y. pestis</i> (KbE/ml)	G 20	4×10^3	2×10^3	4×10^3	1×10^3	5×10^6	3×10^5
<i>C. burnetii</i> (Part./ml)	2F8	3×10^4	5×10^4	1×10^5	4×10^5	2×10^8	1×10^8
<i>F. tularensis</i> (KbE/ml)	FF 11/1/6	4×10^3	1×10^3	$1,5 \times 10^3$	1×10^3	8×10^6	4×10^6
Stx 1 ³	13C4	1:1280 ¹	1:16700 ²	1:8950	1:65900	n. d.	1:160
Stx 2 ³	1B5	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
SEB	Sh- α -SEB	30 pg/ml	7 pg/ml	44 pg/ml	5 pg/ml	2 ng/ml	1,25 ng/ml

n. d. = nicht durchgeführt;

¹ Nachweisgrenze für gereinigtes Toxin: 0,2 ng/ml

² Nachweisgrenze für gereinigtes Toxin: 35 pg/ml

³ angegeben sind jeweils die Endpunkttiter einer Toxoidpräparation

3.2.3.9 Multi-Analyt-System im Mikrotiterplattenformat

Nach der Optimierung der Einzeltests wurde in einem Multi-Analyt-Ansatz überprüft, inwieweit sich die antigenfreien Kontrollwerte bei den Einzeltests unter den für das Biosensor-Format avisierten Testbedingungen verhalten. Dazu wurden die Reihen einer Mikrotiterplatte mit den jeweiligen Fangantikörpern beschichtet und anschließend mit jedem (einzeln und in Kombination) der hergestellten biotinylierten Nachweisantikörper beprobt, wobei die in den optimierten Einzeltests verwendeten Präparationen bzw. Konzentrationen verwendet wurden (Tab. 12).

Als kritisch erwies sich hierbei der Tween20-Zusatz (0,5 %) zur Verdünnungslösung für die biotinylierten Antikörper, der sich beim SEB-Nachweis als besonders vorteilhaft erwiesen hatte. Insbesondere durch den beim Coxiellen-Nachweis verwendeten biotinylierten mAk 2F8 bedingt kam es zu einem deutlichen Anstieg der Kontrollwerte. Bei Einsatz des Gemisches, das alle sechs (ohne den Orthopox-Nachweis) biotinylierten Antikörper enthielt (Gesamtantikörper-Konzentration 8 µg/ml), lagen die Kontrollwerte im Bereich von 0,15 (Francisellen-Nachweis) bis 0,48 (Stx2-Nachweis). Nach Reduktion des Tween20-Anteils auf 0,25 % besserte sich bei einem Großteil der Testsysteme die Situation, als problematisch erwies sich jedoch nach wie vor das Stx2-, sowie das Coxiellen-Testsystem mit Werten von 0,38 bzw. 0,23. Die parallel durchgeführten Einzelansätze zeigten, dass hierfür fast exklusiv die biotinylierten pAk zum Nachweis von SEB verantwortlich waren. Ansätze ohne diesen Antikörper resultierten in deutlich niedrigeren Extinktionswerten von 0,15. Weitere Versuche mit Zusätzen von Schaf-Ig und anderen Proteinen, wie z. B. Schafalbumin, führten zu keiner Verbesserung, der Einsatz kommerziell erhältlicher Konjugat-Verdünnungslösungen resultierte in völlig inakzeptablen Extinktionswerten von 0,6 bis 2,0.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die digoxigenierten Nachweisantikörper erhalten, die Extinktionswerte der antigenfreien Kontrollansätze bewegten sich allerdings auf einem noch höheren Niveau von 0,4 – 0,7. Als besonders kritisch erwiesen sich wiederum der zum Nachweis von Stx 2 verwendete mAk 1B5, sowie der in den Orthopox-Nachweis implementierte mAk 5B1.

Tabelle 12: Übersicht zu den im Multi-Analyt-System bzw. in den optimierten Einzelnachweisen eingesetzten Antikörper-Konjugaten

Nachweis von	Markierter Antikörper	Konzentration (µg/ml)	Verwendete Kopplungsansätze	
			Biotinylierung	Digoxigenierung
<i>Y. pestis</i>	G 20	2	1:44	1:35
<i>C. burnetii</i>	2F8	1	1:88	1:17,5
<i>F. tularensis</i>	FF 11/1/6	2	1:11	1:17,5
Stx 1	13C4	1	1:88	1:35
Stx 2	1B5	1	1:88	1:35
SEB	sh-α-SEB	1	1:44	1:17,5
Orthopoxviren	5B1	2	n. d.	1:35

(n. d. = nicht durchgeführt)

3.2.4 Nachweis im Microarray-Format

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die im Mikrotiterplatten-Format optimierten Einzeltests auf einem Microarray zusammen zu fassen, um so den parallelen Nachweis der verschiedenen Antigene bei uniformer Testdurchführung zu ermöglichen. Da auch ein möglichst sensitiver Nachweis angestrebt wurde, konzentrierten sich die Arbeiten in erster Linie auf Verfahren, in denen peroxidasemarkierte Reagenzien verwendet werden und die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgt.

3.2.4.1 Prinzipieller Aufbau des Biosensors

Im Rahmen dieser grundlegenden Machbarkeitsstudie sollte des Weiteren auch eine Automatisierung des Testablaufs realisiert werden. Dazu wurde in einem gemeinsamen Forschungsprojekt mit dem Institut für Hydrogeologie, Hydrochemie und Balneologie der Technischen Universität München ein neuartiger Biosensor konzipiert. Bei diesem Gerät, im Folgenden als Immunomat (Abb. 19) bezeichnet, erfolgt der Zufluss der Reagenzien und Proben mittels Computer-gesteuerter Pumpen, alle Reagenzien und Proben werden durch diese Flußzelle gepumpt.



Abbildung 19: Foto vom Prototyp des Immunomaten mit Steuerungscomputer und Flußzelle (Ausschnittsvergrößerung) (Foto freundlicherweise überlassen von A. Strasser)

Eine Wand dieser Flußzelle besteht aus einem austauschbaren Biochip auf dem als biologische Komponenten die Antikörper immobilisiert sind. Nach Zugabe der jeweiligen Immunreagenzien erfolgt die Detektion gebundener Antikörper über ein Chemilumineszenzsignal, das die eigentliche Messgröße darstellt. Hervorgerufen wird diese Chemilumineszenz durch an die Antikörper gebundene Peroxidase, welche katalytisch die Substrate Luminol und H_2O_2 umsetzt.

Der Prototyp dieses Messgerätes wurde mehrfach verbessert und überarbeitet. Eine strömungstechnisch neu konzipierte Flusszelle (Abb. 21) sorgte für gleichmäßigere Resultate, durch den Austausch des Flusszellenbodens aus Kunststoff durch einen aus Glas wurde die chemische Resistenz und Dichtigkeit gewährleistet. Daneben wurde ein lichtempfindlicheres Objektiv eingebaut, sowie eine leistungstärkere USB-Schnittstelle vorgeschaltet.



Abbildung 21: Foto der Flusszelle des PASA-Prototyps

3.2.5 Etablierung eines automatisierten Versuchsdurchführung

Der Immunomat ist mit einer programmierbaren Steuerung ausgestattet, die es ermöglicht, die Pumpengeschwindigkeit, die Volumina, die Reihenfolge der Pumpen sowie die Inkubationszeiten zu programmieren. Dadurch soll ein gleich bleibender Versuchsablauf gewährleistet werden. Bei Versuchsbeginn wurde der Immunomat gestartet, initialisiert und mit A. dest. gespült, das Programm lief einmal mit Waschlösung durch. Aufgrund eines Programmfehlers war anschließend in der Regel ein Neustart der Software notwendig. Danach wurden die Reservoirs mit den zur Versuchsdurchführung benötigten Reagenzien (jeweils mind. 1 ml) gefüllt. Die Probe wurde dabei in PBS mit Zusatz von 0,5 % Tween, die markierten Antikörper in PBS mit Zusatz von 1 % Casein und 0,3 % Tween und die peroxidasemarkierten Sekundärreagenzien in PBS mit Zusatz von 1 % Casein gelöst. Nach Einlegen des Biochips in die Flusszelle, wurde diese verschlossen, über eine Pumpe mit Waschpuffer befüllt und durch das Sichtfenster auf Blasenfreiheit kontrolliert. Anschließend erfolgte der Programmstart.

Ziel des programmierten Testablaufs war es, jeder Reaktionskomponente in möglichst kurzer Zeit einen möglichst ausgiebigen Kontakt mit der Chipoberfläche zu erlauben. Da das Volumen des Zulaufschlauches und des Verteilermoduls zusammen bereits 200 µl umfassten, wurde, um eventuell noch vorhandene Reste der Waschlösung zu verdrängen und um die Flusszelle reproduzierbar mit dem jeweiligen Immunreagenz bzw. der Probe zu befüllen, das Einpumpen der ersten 400 µl mit der langsamsten Pumpgeschwindigkeit von 17,5 µl/s durchgeführt. Die restlichen 600 µl wurden in Intervallen von 10 µl mit derselben Geschwindigkeit eingepumpt, um einen kontinuierlichen Durchfluss der Immunreagenzien auf dem Biochip aufrecht zu erhalten. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte mit der Waschpumpe (Volumen 5 ml) eine zweimalige Spülung des Biochips, nach Inkubation der peroxidasemarkierten Reagenzien sogar eine dreimalige. Um Substrat einzusparen, wurden die beiden Substratkomponenten auf 2 Pumpen aufgeteilt und erst unmittelbar bei Bedarf jeweils 0,5 ml zusammen eingepumpt. Das entstehende Signal wurde von einer CCD-Kamera über 1 min aufgezeichnet.

Die Auswertung der angefertigten Fotos erfolgte rein visuell. Dabei wurden Spotbild, Gleichmäßigkeit, Signalstärke, Hintergrundsignal und Gleichmäßigkeit des Hintergrundsignals sowie die Spezifität der einzelnen Antikörperreihen bewertet. Der Vergleich zwischen den in derselben Charge gespotteten und/oder den unter ähnlichen Bedingungen getesteten Slides erfolgte ebenfalls visuell.

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Modifikationen des Testablaufs im Immunomaten programmiert und überprüft, wobei insbesondere die Inkubationszeiten für die Immunreagenzien, die Intensität der Waschschrte und die Fließgeschwindigkeiten variiert wurden. Die Endversion des Steuerungsprogramms ist in verkürzter Form im Anhang zu finden, ein vollständiger Testdurchlauf dauerte 25 min. Dabei wurden die Immunreagenzien (Antigen, markierte Antikörper, peroxidasemarkierte Sekundärreagenzien) bei konsekutiver Testdurchführung jeweils für 5 min im kontinuierlichen Fluss über den Biochip gegeben, zwischen den einzelnen Inkubationsphasen erfolgten Waschschrte. Vorversuche hatten gezeigt, daß durch den kontinuierlichen Zufluss deutlich höhere Signalintensitäten erreicht werden konnten, als bei einer statischen Inkubation. Nach Testende wurde das System routinemäßig zunächst mit Waschlösung und danach mit A. dest. gespült.

Bei längerem Gebrauch des Immunomaten bildete sich allerdings in den schlecht zugänglichen Schläuchen, Pumpen und dem Verteilermodul ein Biofilm, der den Antigennachweis stark störte. Dies äußerte sich z. T. in einer fortschreitenden Reduktion der Signalintensitäten bzw. in einem gehäuften Auftreten von falsch-positiven Befunden. In unregelmäßigen Abständen erfolgte deswegen ein Ausbau aller mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommenden Teile und deren Reinigung im Ultraschallbad unter Einwirkung einer Pepsin/HCl Lösung. Dennoch mussten nach dieser Prozedur vor allem im Verteilermodul makroskopisch sichtbare Reste des Biofilms soweit zugänglich auch mechanisch entfernt werden. Dieses Problem ist sicherlich auch darauf zurückzuführen, daß die meisten der verwendeten Antigenpräparationen de facto ungereinigte Kulturen bzw. Kulturüberstände von Bakterien waren.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des Immunomaten bestand darin, dass Leckagen im Gerät oft die Auffangkapazität der Flußzelle überforderten und infolgedessen Kameraobjektiv, Steckverbindungen und Platinen überflutet wurden. Die durch die ausgetretenen Salze entstandenen Korrosionen wurden soweit wie möglich mechanisch mit Wasser und Alkohol gereinigt, getrocknet, nachgelötet und schwach gefettet oder

ausgetauscht. Um immer wieder auftretende Wackelkontakte und dadurch bedingte Ausfälle zu vermeiden, wurden zudem sämtliche Platinen im Gerät von Hand nachgelötet.

Aufgrund dieser Prototyp-bedingten Probleme wurde in der vorliegenden Arbeit ein Teil der Versuche von Hand außerhalb des Immunomaten durchgeführt, um zu große zeitliche Verzögerungen zu vermeiden.

3.2.6 Manuelle Versuchsdurchführung

Zur Testdurchführung wurden kommerziell erhältliche Inkubationskammern für Objektträger verwendet, das zur Inkubation der Biochips mit den Immunreagenzien verwendete Volumen betrug 0,5 ml. Ein Inkubationsschritt unter leichter Bewegung dauerte 20 min, danach folgte eine Spülung des Chips mit Waschlösung per Hand aus einer Spritzflasche. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurde wiederum ausgiebig gespült und die Slides bei Raumtemperatur bzw. bei Einsatz von Fluoreszenz markierten Antikörpern unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates wurden die Biochips im Imager der Fa. Kodak über 1 min vermessen.

3.2.7 Herstellung und Überprüfung von Microarrays

3.2.7.1 Microarray-Spotter

Zur Immobilisierung der entsprechenden Antikörper auf dem Biochip wurden zwei verschiedene, kommerziell erhältliche Spotter (Pin-and-Ring-Arrayer, Fa. MWG BIOTECH, bzw. Microarray-Spotter, Fa. GESIM) mit Modellantikörpern getestet. Die zur Beschichtung der Biochips durchgeführten orientierenden Versuche ergaben, dass beide getesteten Verfahren prinzipiell die für das Projekt nötige Beschichtungsdichte ermöglichen und auch die Kapazität zur Herstellung größerer Chipzahlen besitzen.

Ein wesentlicher Vorteil des schließlich für die weiteren Versuche verwendeten kontaktfreien Piezospotters der Fa. GESIM lag vor allem darin, dass bei beschichteten Slides die Oberfläche nicht beschädigt wird. Die Antikörper werden dabei von einer Glasspitze, deren Rückwand aus einem Piezokristall besteht, aus Nöpfchen gesaugt und durch das Anlegen einer Spannung an dem Kristall in winzigen Tröpfchen auf die Slide-Oberfläche aufgebracht. Das aufgesprühte Volumen ist durch die Anzahl an Spannungsimpulsen variabel, üblicherweise wurden 5 x 1 nl aufgetragen. Die angelegte Spannung muss allerdings für jede Spitze und in

Abhängigkeit von der Viskosität der aufzutragenden Lösung empirisch ermittelt werden, da es bei zu niedriger Spannung zu keinen Spots, bei zu hoher dagegen zur Satellitenbildung (Spray) kommen kann.

Im Laufe der Untersuchungen bewegten sich die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten optimalen Spitzenspannungen im Bereich von 70 bis 85 mV. Grundsätzlich wurden etwa 5 nl pro Auftragspunkt appliziert, die so generierten Spots wiesen Durchmesser von 200 – 300 μm auf. Der Abstand zwischen den verschiedenen vertikalen Spotreihen, die aus 5 – 10 identischen Replikaten bestanden, betrug 500 μm . Abb. 23 verdeutlicht anhand von zwei mit Peroxidase (24 Einzelspots pro Ansatz, verschiedene Konzentrationen) beschichteten Membranen, die entweder mit einem chromogenen (TMB) oder einem lumineszierenden Substrat (SuperSignal ELISA Pico) versetzt wurden, die intra-assay Reproduzierbarkeit der Beschichtung.

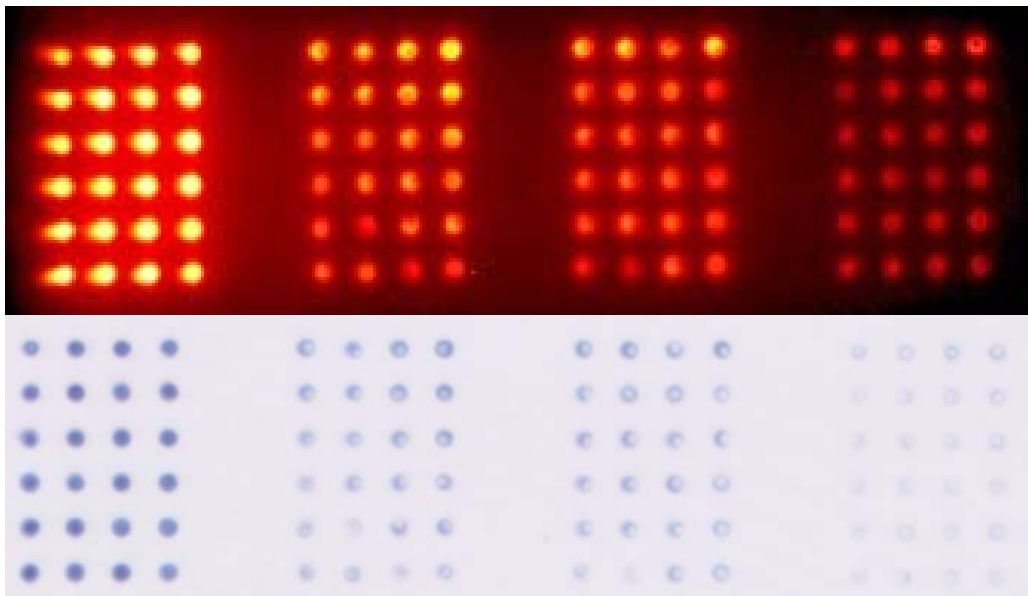


Abbildung 22: Mit dem Microarray-Spotter erzielte Beschichtungsdichten (ca. 250 μm Spotgröße im 500 μm Abstand). Vergleich verschiedener Peroxidase-Substrate: (oben) lumineszierendes Substrat (unten) präzipitierendes, chromogenes Substrat (Tetramethylbenzidin mit Zusatz von Dextransulfat)

3.2.7.2 Überprüfung verschiedener Biochip-Oberflächen

Prinzipiell können Antikörper entweder adsorptiv (wie an Mikrotiterplatten) oder über eine kovalente Bindung an Biochips immobilisiert werden, wobei beide Systeme Vor- und Nachteile im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und universelle Einsetzbarkeit haben. Die im Rahmen des Projektes überprüften Biochips, die eine Palette der verschiedenen kommerziell erhältlichen Oberflächen (-strukturen) repräsentieren, sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zum Nachweis von Agenzien überprüfte, kommerziell erhältliche Biochips. Slides, die prinzipiell zur Immobilisierung von Antikörpern geeignet sind, wurden mit Plus gekennzeichnet, nicht geeignete mit Minus.

Bezeichnung	Oberfläche	Hersteller	Eignung
QMT Aldehydslide	Aldehyd	Peqlab	+
Silyated Microscope Slides	Aldehyd	Greiner Bio-one	+
Nexterion Slide A	Aminosilan	Schott Nexterion AG	+
CT Slides	Carboxyl	Xantec SL CX	-
QMT Epoxyslide	Epoxy	Peqlab	+
Easy Spot®	Epoxy	Biocat	+
EPD Slides	Epoxyaktiviertes Dextran Hydrogel	Xantec SL EPD	-
Hydrogel™ Slide	Hydrogel™	Perkin Elmer	+
Fast Slides	Nitrocellulose-membran	Schleicher & Schuell	+
Vivid™ Gene Array Slides	Nylonmembran	Pall Life Science PN	+
Clear Polymer bzw. Black Polymer	Polystyrol	Nunc™	+
Streptavidin Slide	Streptavidin	Greiner Bio-one	+
QMT Protein Slide	unbekannt	Peqlab	+

Um die grundsätzliche Eignung der Chipoberflächen für die Immobilisierung von Antikörpern zu verifizieren, wurden in einem ersten Schritt die Slides mit 1 µl Portionen der in PBS gelösten, spezifischen Fangantikörper beschichtet und dann unter klassischen EIA-Bedingungen mit den weiteren Immunreagenzien (Antigen, markierte Nachweisantikörper, peroxidasemarkiertes Sekundärreagens) behandelt. Nach Zugabe des chemilumineszierenden Substrates wurden die Slides mittels CCD-Kamera ausgewertet. Mit Ausnahme der von der Fa. Xantec vertriebenen Biochips konnte bei allen überprüften Oberflächen eine Immobilisierung der Antikörper nachgewiesen werden (Tab. 13), wobei allerdings v. a. bei einer kovalenten Bindung der Immunglobuline an die Slides bei bestimmten Antigen-Nachweisen auch negative Ergebnisse auftraten. Da nach Zugabe eines peroxidasemarkierten, tierartspezifischen Sekundärantikörpers (anti-Maus- bzw. anti-Schaf-Ig) die entsprechenden MAK's regelmäßig auf den Slides nachweisbar waren, sind diese Fehlschläge auf eine Inaktivierung der entsprechenden Fangantikörper zurückzuführen. Abb. 23 zeigt einige Ergebnisse, die während dieser Vorversuche erhalten wurden.

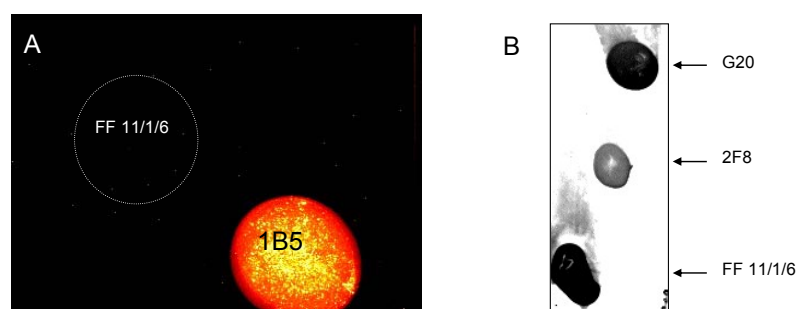


Abbildung 23: *Aktivität verschiedener Fangantikörper nach Immobilisierung auf (A) Aldehyd-Slides bzw. (B) Streptavidin-Slides*

Zur detaillierteren Evaluierung der kommerziell erhältlichen Slides wurden die weiteren Versuche im PASA-Prototyp üblicherweise unter folgenden Testbedingungen durchgeführt:

- Beschichtung der Slides mittels Microarray-Spotter in vertikalen Reihen (sieben Spotreplikate pro Reihe) alternierend mit den verschiedenen spezifischen Fangantikörpern bzw. Kontrollreagenzien unter den oben skizzierten Bedingungen; Beschichtungskonzentrationen 2 – 5 ng Antikörper/Spot;
- Absättigung mit PBS mit Zusatz von 3 % Casein;

- Verwendung eines standardisierten Antigengemisches bestehend aus den inaktivierten Präparationen von *Y. pestis* (1:2000), *C. burnetii* (1:1000) bzw. *F. tularensis* (1:1000), sowie einem Stx2-Toxoid (1:1000), Stx1-Toxin (50 ng/ml) und SEB (25 ng/ml); als Verdünnungslösung wurde PBS mit Zusatz von 0,5 % Tween 20 verwendet;
- Konzentration der jeweiligen antigenspezifischen Nachweisantikörper 1 - 2 µg/ml verdünnt in PBS mit Zusatz von 1 % Casein und 0,25 % Tween 20;
- ExtrAvidin 1:1.000 verdünnt in PBS mit Zusatz von 1 % Casein (das Digoxigenin-System stand erst zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchungen zur Verfügung);
- SuperSignal ELISA Femto als chemilumineszierendes Substrat.

Als Positivkontrolle wurde zudem auf jedem Chip eine Reihe peroxidasemarkiertes anti-Maus-Ig (α mIg-HRP) aufgetragen, anhand derer der ordnungsgemäße Ablauf des Spottingprozesses kontrolliert werden konnte.

Die Verwendbarkeit der unterschiedlichen Slides, von denen für die Untersuchungen jeweils mindestens fünf Stück an verschiedenen Tagen beschichtet wurden, wurde generell nach folgenden Kriterien beurteilt:

- unspezifische Hintergrundfärbung

Dazu wurde in einem antigenfreien Ansatz ein beschichteter Chip mit einer Mischung der markierten Nachweisantikörper (Gesamtkonzentration 8 – 10 µg/ml) beprobt, deren unspezifische Bindung anschließend mittels ExtrAvidin-HRP nachgewiesen wurde.

- antigenspezifisches Signal

Dazu wurden die Chips mit dem oben erwähnten standardisierten Antigengemisch, sowie den weiteren Nachweisreagenzien unter den automatisierten Bedingungen des PASA-Prototyps versetzt und anschließend die dadurch generierten Spotintensitäten qualitativ und quantitativ beurteilt.

- Immobilisierung und Spothomogenität

Dazu wurden die Biochips mit tierartspezifischen, peroxidasemarkierten Nachweisantikörpern (α mIg-HRP bzw. α hIg-HRP) beprobt, so dass unabhängig von der Aktivität des Beschichtungsantikörpers die einheitliche Belegung des Slides überprüft werden konnte.

3.2.7.2.1 Kovalent bindende Chipoberflächen

Für die kovalente Bindung werden für die Entwicklung von Microarrays derzeit von verschiedenen Firmen voraktivierte Glasobjektträger (Slides) mit unterschiedlich modifizierten Oberflächen angeboten, wobei üblicherweise von den Anbietern nur deren Eignung zur Immobilisierung von DNA garantiert wird. Nach Modifizierung der Glasoberflächen stehen zur Kopplung eines Liganden entweder freie -CHO- (Aldehyd-aktiviert) oder Epoxy-Gruppen zur Verfügung. Dies kann zum einen je nach Qualität der Aktivierung die Belegungsdichte mit entsprechenden Liganden limitieren, zum anderen ist bei der Kopplung eines Antikörpers ein Verlust der immunologischen Aktivität nicht auszuschließen, da die Bindung rein zufällig erfolgt.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden unterschiedliche Konzentrationen der zur Verfügung stehenden Beschichtungsantikörper auf Slides verschiedener Hersteller immobilisiert und dann im PASA-Prototyp unter den oben skizzierten Bedingungen getestet (Abb. 24).

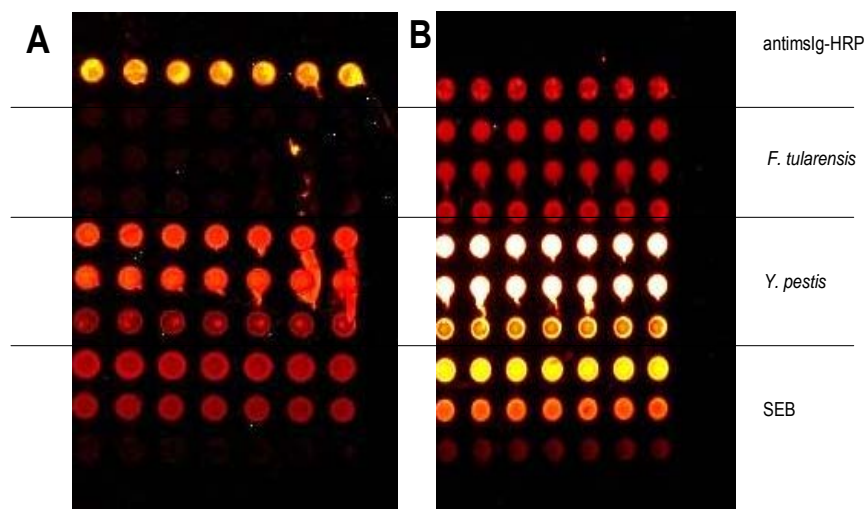


Abbildung 24: Immobilisierung und Funktionalität der mAk (jeweils 10, 75 bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$) zum Nachweis von *F. tularensis*, *Y. pestis* und SEB auf Aldehyd-aktivierten Slides. Mittels CCD-Kamera generierte Bilder nach Zugabe von (A) antigenspezifischen Nachweis-antikörpern bzw. (B) tierartspezifischen Sekundärantikörpern

Wie sich bereits in den Vorversuchen angedeutet hatte, kam es zwar durch die kovalente Immobilisierung zu einer weitestgehenden Inaktivierung der Antikörper zum Nachweis von *F. tularensis*, ansonsten zeichneten sich diese Slides aber durch einen sehr niedrigen Hintergrund und ein homogenes Spotbild aus. Mit Ausnahme des mAk FF11/1/6 war des Weiteren eine konzentrationsabhängige Immobilisierung der Antikörper festzustellen, beim Yersinien-Nachweis konnten bereits bei Konzentrationen von 10 µg/ml (entspricht 0,05 ng mAk pro Spot) antigenspezifische Signale erhalten werden. Dass zwischen den jeweiligen Antikörpern Unterschiede in der Kopplungseffizienz bestehen, konnte auch anhand der Nachweise von *C. burnetii*, Stx 1 und Stx 2 dokumentiert werden (Abb. 25). Obwohl hier deutlich höhere Ausgangskonzentrationen (250 µg/ml) verwendet wurden, konnte z.B. für den mAk 2H3 (Stx1-Nachweis) mittels αmIg-HRP anhand der Spotintensität erst ab 500 µg/ml eine Sättigungskonzentration beobachtet werden. Die antigenspezifischen Signale waren jedoch hiervon nicht beeinflusst. Die beim Coxiellen-Nachweis beobachteten Probleme wurden - wie spätere Untersuchungen zeigten - nicht durch eine generelle Inaktivierung des mAK hervorgerufen. Ursächlich für die anfänglich unbefriedigenden Ergebnisse war vielmehr eine Instabilität der ursprünglich verwendeten Antigenpräparation.

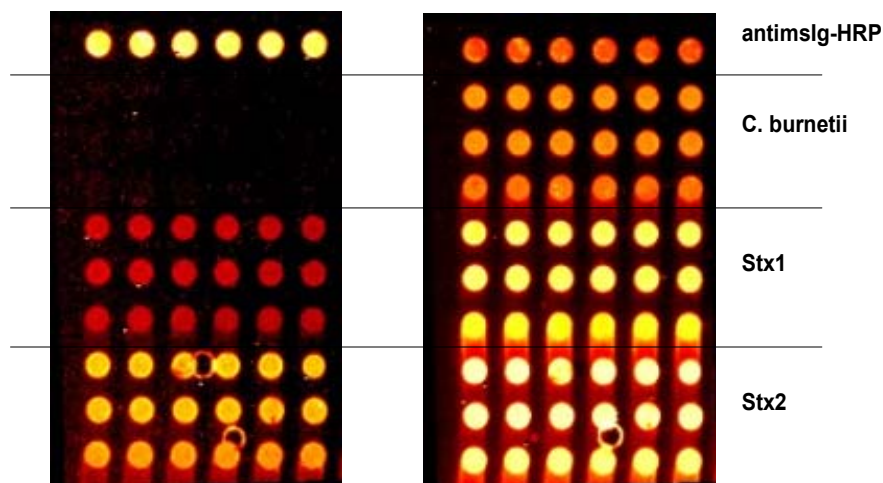


Abbildung 25: Immobilisierung und Funktionalität der mAk (jeweils 250, 500 bzw. 1000 µg/ml) zum Nachweis verschiedener B-Agenzien auf Aldehyd-aktivierten Slides. Mittels CCD-Kamera generierte Bilder nach Zugabe von (A) antigenspezifischen Nachweisantikörpern bzw. (B) tierartspezifischen Sekundärantikörpern

Im Hinblick auf die Homogenität der Aktivierung wurden die überzeugendsten Ergebnisse mit den QMT Slides der Fa. Peqlab (früher vertrieben durch Fa. Quantifoil, Jena) erhalten, wobei sich die weiteren Untersuchungen insbesondere auf Aldehyd-aktivierte Oberflächen konzentrierten, da bei Epoxid-aktivierten Slides des öfteren unregelmäßige, ausgefranste Spots auftraten.

3.2.7.2.2 Adsorptive Oberflächen

Da bei diesen Slides die Bindung der Antikörper nur adsorptiv erfolgt, ist prinzipiell im Gegensatz zu den kovalent bindenden Slides eine Inaktivierung der Antikörper unwahrscheinlicher. Allerdings besteht die Gefahr, dass durch ein sog. Bleaching-out der Immunreagenzien, die Versuchsergebnisse massiv beeinträchtigt werden. Dies gilt insbesondere für den Einsatz im PASA-Prototyp, bei dem mit vergleichsweise rigiden Durchflussbedingungen gearbeitet wird. Grundsätzlich lässt sich diese Biochip-Gruppe im Hinblick auf die verwendeten Materialien in drei verschiedene Untergruppen einteilen, nämlich Glas-, Plastik- und Membranbasierte Slides. Theoretisch sollten bei letzteren aufgrund der strukturierten Oberfläche höhere Antikörper-Konzentrationen zu immobilisieren sein.

3.2.7.2.2.1 Glas-Slides

Als Vertreter dieser Gruppe wurde der von der Fa. Schott vertriebene Nexterion Slide A überprüft, dessen Oberfläche aus einer patentierten Multi-Aminosilan-Schicht besteht. Die Beschichtungsantikörper wurden in einer Konzentration von 500 µg/ml aufgetragen, wobei auch verschiedene Verdünnungslösungen (PBS bzw. Bicarbonatpuffer jeweils mit und ohne Zusatz von 30 % Glycerin) getestet wurden. Die in Abb. 27 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass diese Biochips bei allen überprüften Kriterien (Hintergrundsignal, Homogenität, Spotintensitäten) im Vergleich zu den Aldehyd-aktivierten Oberflächen deutliche Nachteile aufwiesen. Die Zusätze von Glycerin, die laut Literaturangaben durch Verringerung der Verdunstungsrate ein schnelles Eintrocknen der Spots verhindern und somit einen stabilisierenden Effekt auf die Antikörper-Aktivität haben sollen, erwiesen sich nur partiell als förderlich (Abb. 26). Stx1 bzw. *F. tularensis* konnte auf diesen Slides nicht nachgewiesen werden.

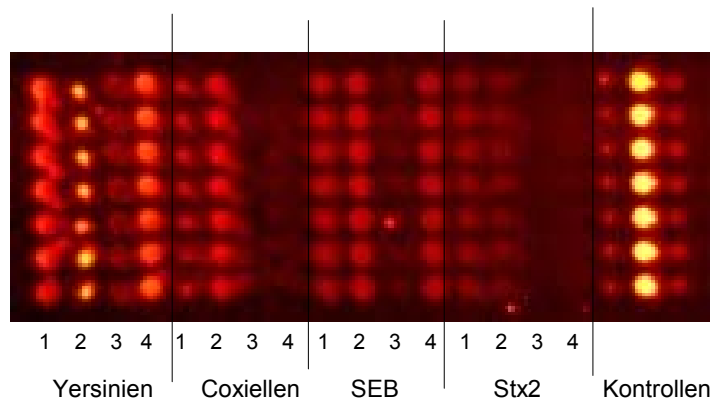


Abbildung 26: *Immobilisierung und Funktionalität der mAk (jeweils 500 µg/ml) zum Nachweis verschiedener B-Agenzien auf Nexterion Slide A. Zur Beschichtung wurden die Antikörper in PBS oder Bicarbonatpuffer ohne (1 bzw. 3) bzw. mit Zusatz von 30 % Glycerin (2 bzw. 4) verdünnt.*

3.2.7.2.2 Plastik-Slides

Diese Variante wird im Wesentlichen von den auf modifizierten Polystyrol-Oberflächen basierenden Chips der Firma Nunc repräsentiert. Da hierbei das gleiche Material wie bei den zur Optimierung der EIA's eingesetzten Mikrotiterplatten verwendet wird, wurden diese Slides als viel versprechende Alternative in die Untersuchungen einbezogen. Es zeigte sich allerdings relativ schnell, dass in Abhängigkeit von der Testdurchführung (PASA-Prototyp bzw. off-line in Objektträgerkammern) sehr deutliche Unterschiede bei den Ergebnissen, insbesondere den Spotintensitäten auftraten. Deswegen wurde unter Verwendung von mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Konjugaten beschichteten Slides der durch die PASA-Durchflussbedingungen induzierte Bleaching-out Effekt kontrolliert. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, wurden bei den Black-Polymer Slides bereits nach einem vollständigen Testdurchgang im PASA fast das gesamte immobilisierte Material weggewaschen, während bei den alternativ überprüften Slides ein Großteil des Streptavidins gebunden blieb.

Für antikörperbeschichtete Slides stellte sich die Situation etwas besser dar (Abb. 28). Trotz sequentieller Testdurchführung (jedes Antigen wurde einzeln in einem vollständigen Testzyklus nachgewiesen) ließen sich nach insgesamt 6 Durchgängen noch Beschichtungsantikörper auf dem Slide nachweisen. Antigenspezifische Reaktionen konnten jedoch nur für vier der überprüften sechs Nachweisverfahren erhalten werden, wobei sich ein von der Fa. Schleicher-Schuell vertriebener Printing-Puffer beim Yersinien- bzw. Coxiellen-Nachweis bewährte.

Bei manueller Testdurchführung (3.2.6) konnten hingegen für alle auf dem Biochip implementierten Nachweise positive Resultate erzielt werden (Abb. 29).

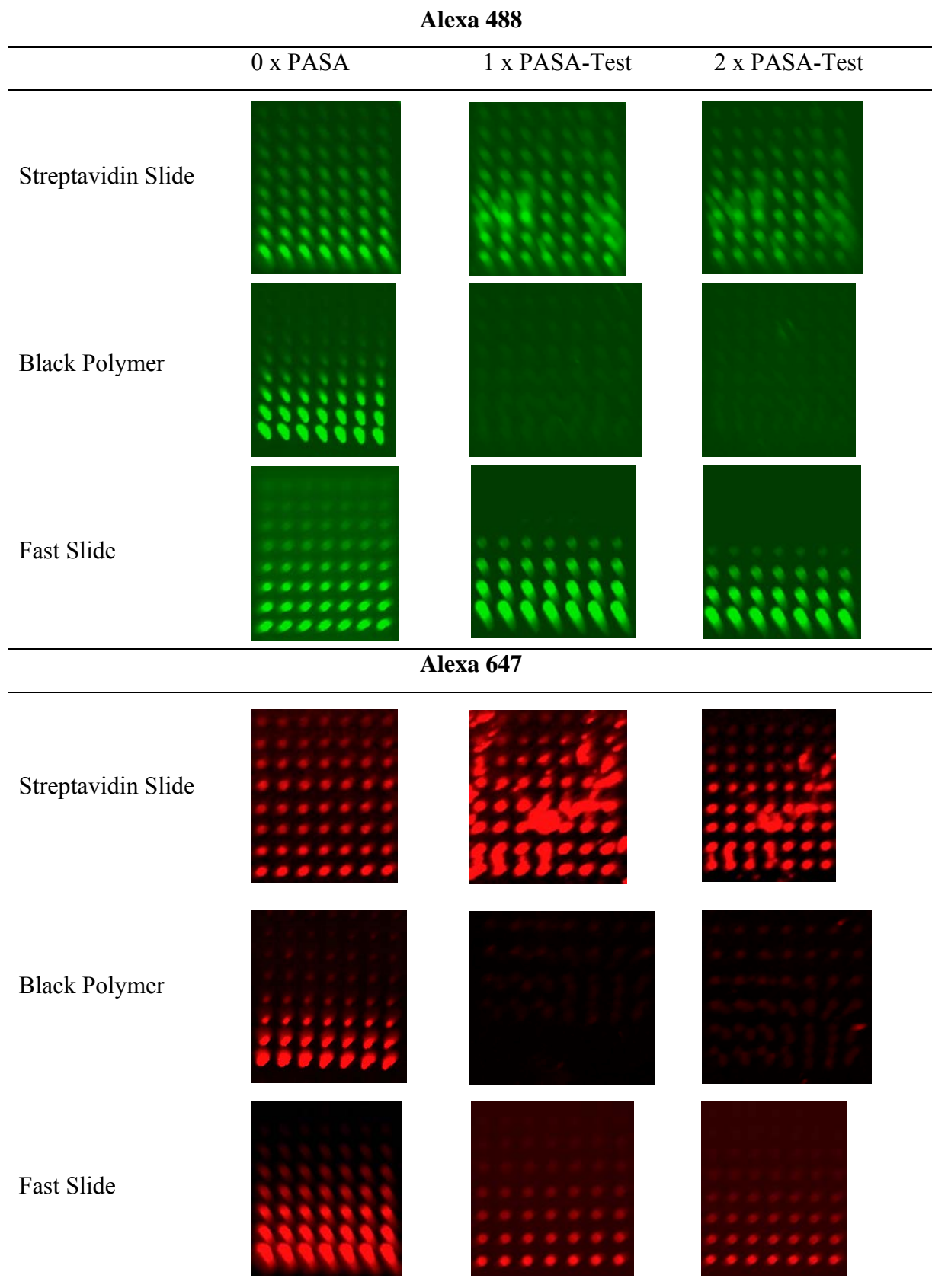


Abbildung 27: Bleaching-out Effekte bei verschiedenen Microarrays beschichtet mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Konjugaten (Ausgangskonzentration 500 $\mu\text{g/ml}$; 1:2 Verdünnung)

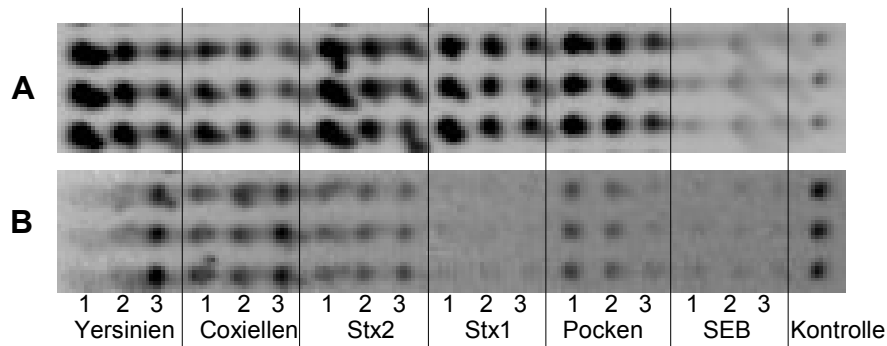


Abbildung 28: *Immobilisierung und Funktionalität von mAk zum Nachweis verschiedener Agenzien auf Clear Polymer Slides. Zur Beschichtung wurden die Antikörper entweder in Bicarbonatpuffer (1), PBS (2) oder einem Printing-Puffer (3) verdünnt. Bild nach insgesamt sechs Testdurchläufen im PASA: Zugabe von (A) tierartspezifischen Sekundärantikörpern bzw. (B) antigenspezifischen Nachweisantikörpern*

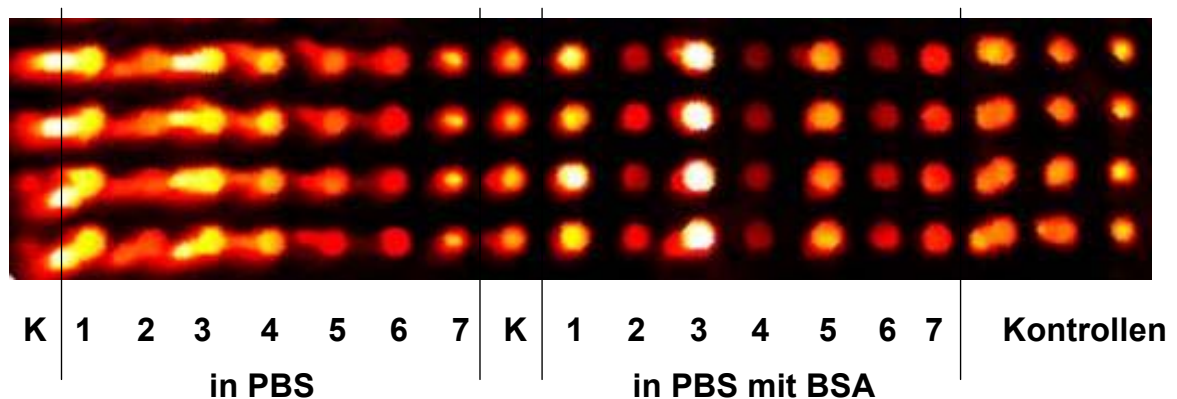


Abbildung 29: *Funktionalität von mAk zum Nachweis verschiedener Agenzien auf Black Polymer Slides bei manueller Testdurchführung und unter Verwendung digoxigenerter Nachweisantikörper. Zur Beschichtung wurden die Antikörper (500 µg/ml) entweder in PBS oder in PBS mit Zusatz von 1 % BSA verdünnt.*

K: Kontrolle (peroxidasemarkierte Antikörper; 6 µg/ml)

1: Nachweis von Y. pestis

2: Nachweis von C. burnetii

3: Nachweis von Stx2

4: Nachweis von Stx1

5: Nachweis von F. tularensis

6: Nachweis von Orthopox-Virus

7: Nachweis von SEB

3.2.7.2.2.3 Membran-beschichtete Slides

Membranbasierte immunchemische Verfahren sind v. a. auf dem Schnelltest-Sektor weit verbreitet, da aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Membranen die Immobilisierung auch hoher Antikörper-Mengen möglich ist. Für Microarray-Zwecke stehen zwei Fabrikate zur Verfügung, zum einen der auf einer Nylon-Membran basierende Vivid Gene Array Slide der Fa. Pall und zum anderen der FAST-Slide (Fa. Schleicher-Schuell), bei dem eine Nitrocellulose-Membran das Reaktionsfeld darstellt. Die Immobilisierung der Antikörper auf diesen Slides erwies sich als unproblematisch, allerdings war eine mangelhafte Kompatibilität dieser Slides mit der im PASA-Prototyp eingebauten Flusszelle zu beobachten. Insbesondere der Einsatz des Vivid-Slides führte aufgrund der relativ hohen Schichtdicke der auf einen Glasobjektträger aufgeklebten Membranstruktur regelmäßig zu massiven Leckagen in der Flusszelle, so dass sich die weiteren Arbeiten auf die FAST Slides konzentrierten. Im Gegensatz zum üblichen Verfahren erwies sich bei diesen Biochips die Absättigung mit 3 % Casein als kontraproduktiv (Abb. 30). Nach dem Blockierungsschritt trat eine deutlich erhöhte Hintergrundfärbung auf und die Einzelspots hinterließen einen verwaschenen Eindruck. Ohne Absättigungsschritt zeichneten sich die Slides jedoch durch ein ausgezeichnetes Signal/Rausch-Verhältnis aus, bei sechs von sieben implementierten Nachweisverfahren konnten unter Verwendung biotinylierter Nachweisantikörper antigenspezifische Signale erhalten werden.

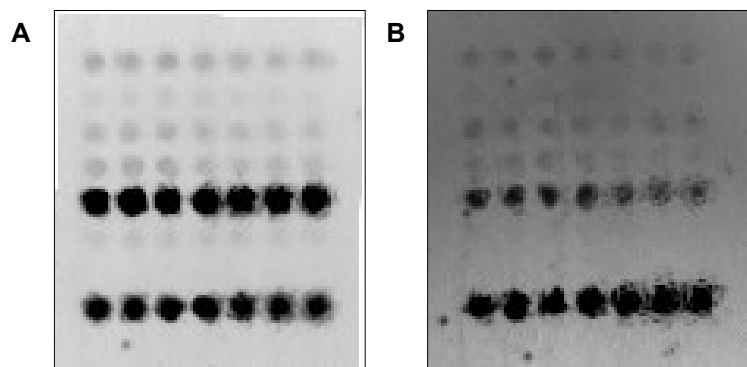


Abbildung 30: Einfluss eines Absättigungsschrittes auf die Hintergrundfärbung bei FAST Slides. (A) ohne (B) nach Absättigung mit 3 % Casein/PBS

3.2.7.2.3 Streptavidin beschichtete Oberflächen

Streptavidin beschichtete Glasslides, wie sie von der Fa. Greiner bio-one angeboten werden, bieten die Möglichkeit biotinylierte Antikörper unabhängig von der Inaktivierungsproblematik mit hoher Affinität an Glasslides zu immobilisieren, erfordern allerdings die Etablierung eines alternativen Detektionsprinzips, wie beispielsweise das im Rahmen des Forschungsprojektes realisierte Digoxigenin-System. Obwohl bei Vorversuchen vielversprechende Ergebnisse erhalten werden konnten (Abb. 23), konnten bei der Evaluierung dieser Slides unter PASA-Bedingungen keine Verbesserung im Vergleich zu den Aldehyd-aktivierten bzw. Nitrocellulose-beschichteten Biochips festgestellt werden. Die Immobilisierung der biotinylierten Antikörper ließ sich zwar nachweisen, ein antigenspezifischer Nachweis gelang allerdings nur bei drei von sieben überprüften Tests (Abb. 31). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass auf den Glasslides noch aktive, funktionelle Gruppen vorhanden sind, die mit den aufgetragenen Antikörpern reagieren und u.U. so inaktivieren. Im Übrigen wiesen auch die in Abb. 27 dargestellten Bleaching-out Experimente auf eine kovalente Bindung des aufgetragenen Streptavidins hin. Auch weitere Versuche, in denen biotinylierte und nicht biotinylierte Fangantikörper vergleichend auf einem Slide immobilisiert wurden, belegen, dass die Bindung der Liganden an diese Slides nicht Streptavidin-spezifisch erfolgt (Abb. 32).

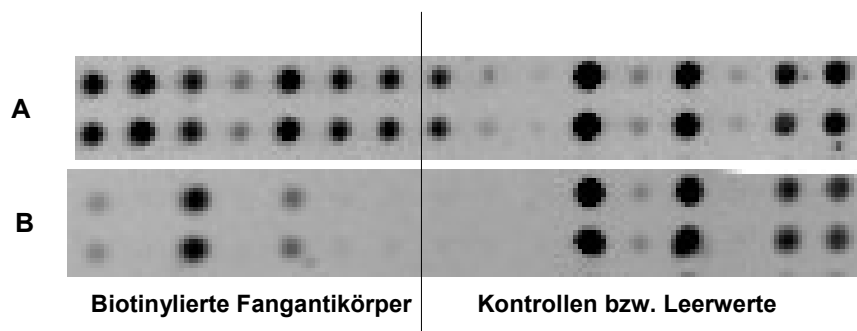


Abbildung 31: *Immobilisierung und Funktionalität von biotinylierten MAk (jeweils 800 µg/ml) zum Nachweis verschiedener B-Agenzien auf Streptavidin-Slides. Inkubation mit (A) tierartspezifischen Sekundärantikörpern bzw. (B) antigenspezifischen, digoxigenierten Nachweisantikörpern*

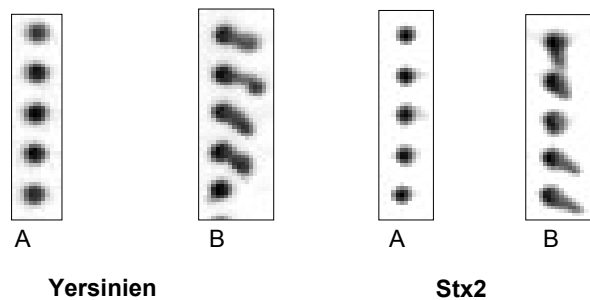


Abbildung 32: *Immobilisierung biotinylierter (A) bzw. unmarkierter (B) Fangantikörper zum Nachweis von *Y. pestis* und Stx2 auf Streptavidin-beschichteten Slides. Antigen-spezifischer Nachweis mittels PASA-Prototyp*

3.2.7.2.4 Biochips mit patentierten Oberflächen

Dazu gehören die von der Quantifoil Micro Tools entwickelten und inzwischen von Peqlab vertriebenen QMT Protein Slides, sowie die speziell zur Immobilisierung von Proteinen empfohlenen Hydrogel-coated Slides der Fa. Perkin Elmer. Letzterer besteht aus einem chemisch modifizierten Polyacrylimid-Gel, das laut Herstellerangaben die Bindung höherer Proteinkonzentrationen aufgrund der 3-D Struktur der Matrix ermöglicht und zudem durch die wässrige Umgebung die funktionelle Aktivität von Antikörpern gewährleisten soll.

Die Chemie der QMT Protein Slides (Glasslides) ist Firmengeheimnis, höchstwahrscheinlich handelt es sich um eine kovalent bindende Oberfläche. Unter den in 3.2.7.2 beschriebenen Bedingungen verhielten sie sich zumindest genauso wie die Aldehyd-aktivierten Slides, d.h. mit Ausnahme von *F. tularensis* konnten alle überprüften Analyten nachgewiesen werden. Abb. 33 zeigt, dass bei diesen Slides trotz sequentieller Testdurchführung im PASA auch nach sieben Testzyklen kein Efflux gebundener Immunreagenzien auftritt. Eine Zunahme unspezifischer Reaktionen war ebenfalls im Versuchsablauf nicht nachzuweisen, die beim Stx2-Nachweis zu sehende Fahnenbildung ist auf eine Überladung mit Antigen zurückzuführen.

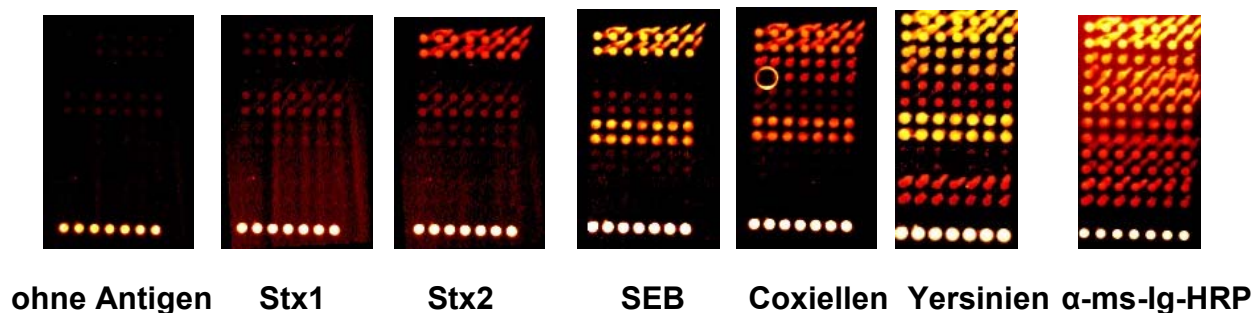


Abbildung 33: *Sequentieller Nachweis von B-Agenzien auf einem QMT Protein Slide (zwei Testreihen/Antigen). Jedes Antigen wurde einzeln nach einem vollständigen Testzyklus im PASA-Prototyp nachgewiesen (Bilderfolge fortlaufend von links nach rechts). Zur Kontrolle unspezifischer Reaktionen wurde der Slide zuerst nur mit einem Gemisch der biotinylierten Antikörper inkubiert (1. Bild; unterste Reihe entspricht der Peroxidase-Kontrolle). Zuletzt erfolgte die Zugabe tierartspezifischer Sekundärantikörper, um die nicht reaktiven Reihen (*F. tularensis*) sichtbar zu machen*

Die Hydrogel-Slides bewährten sich in den eigenen Untersuchungen hingegen nicht. Prinzipiell war es zwar möglich, die Antikörper unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität zu immobilisieren (Abb. 34), andererseits traten jedoch bedingt durch die 3D-Struktur der Matrix hohe unspezifische Background-Signale auf. Die zur Reduzierung des Backgrounds vom Hersteller vorgeschlagenen ausgiebigen und zeitintensiven Waschschrte (3 x 10 min nach jedem Inkubationsschritt) sind im Hinblick auf die Etablierung eines Schnelltests inakzeptabel. Antigenspezifische Signale konnten zumindest bei manueller Testdurchführung für sechs (Stx 1 Toxin war bei anderen Versuchen in höheren Konzentrationen nachweisbar) der überprüften sieben Testsysteme erhalten werden. Beim Pocken-Nachweis wurde hingegen massive unspezifische Reaktionen beobachtet (nicht dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass von den überprüften Biochips nur die FAST Slides und mit Abstrichen die Aldehyd-aktivierten Slides die für die Etablierung eines automatisierten Schnellnachweises notwendigen Voraussetzungen (niedrige Hintergrundfärbung, Immobilisierung der Antikörper unter Erhalt der biologischen Aktivität, Kompatibilität mit den rigiden PASA-Durchflussbedingungen) erfüllten.

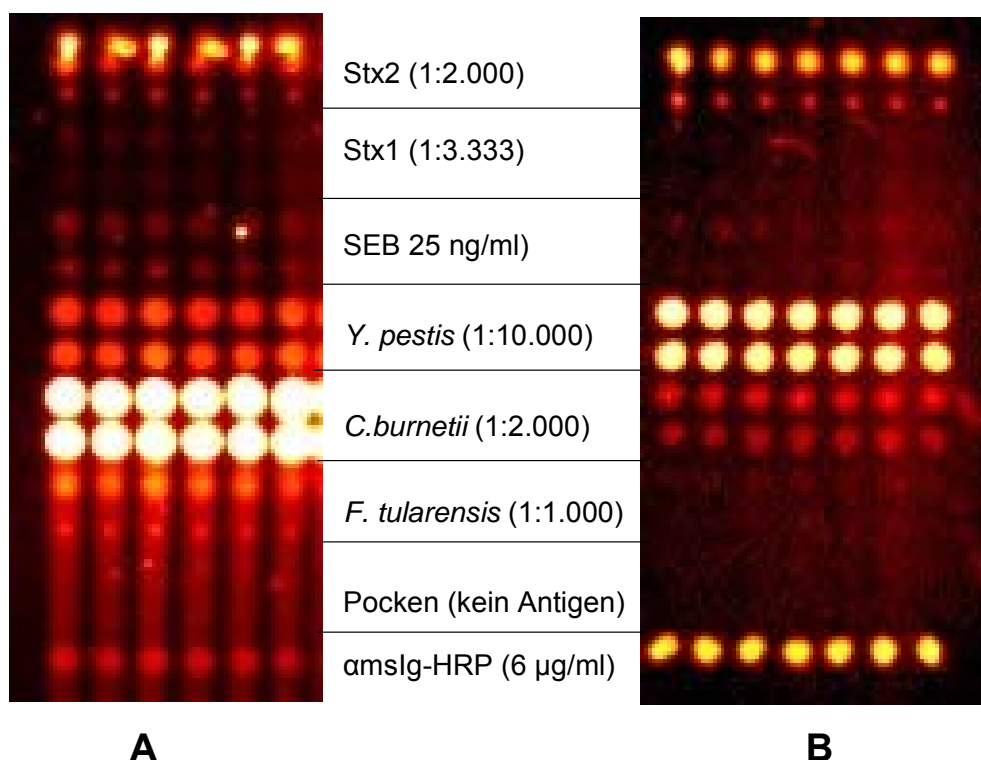


Abbildung 34: Unter verschiedenen Versuchsbedingungen inkubierte Hydrogel-Slides zum Nachweis von B-Agenzien: (A) manuelle Versuchsdurchführung (B) Test im PASA. Beschichtungsantikörper wurden in Konzentrationen von 250 (jeweils untere Reihe eines Analyt-Testfeldes) bzw. 500 µg/ml (jeweils obere Reihe) aufgetragen.

3.2.8 Optimierung der Microarray-Verfahren

3.2.8.1 Aldehyd-aktivierte Biochips

Abgesehen von der Inaktivierung des *F. tularensis* Nachweisantikörpers traten bei der Etablierung dieses Microarray-Verfahrens keine größeren Probleme auf, so dass sich die Optimierung auf einige wenige Aspekte beschränken konnte. Zuerst wurde überprüft, ob durch die Verwendung alternativer Spottingpuffer die Aktivität des mAk FF/11/6 während der Kopplung erhalten werden kann bzw. ob die Immobilisierungsrate, sowie die Restaktivität der anderen zur Beschichtung verwendeten Antikörper dadurch gesteigert wird. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abb. 35 dargestellt. Beim Francisellen-Nachweis konnte durch die alternativ überprüften Spottingpuffer (PBS bzw. Bicarbonatpuffer mit Zusätzen von Glycerin bzw. Trehalose) keine Verbesserung erzielt werden. Der bei den anderen Nachweisen intensiver überprüfte Bicarbonatpuffer bewirkte zwar bei allen Antikörpern eine

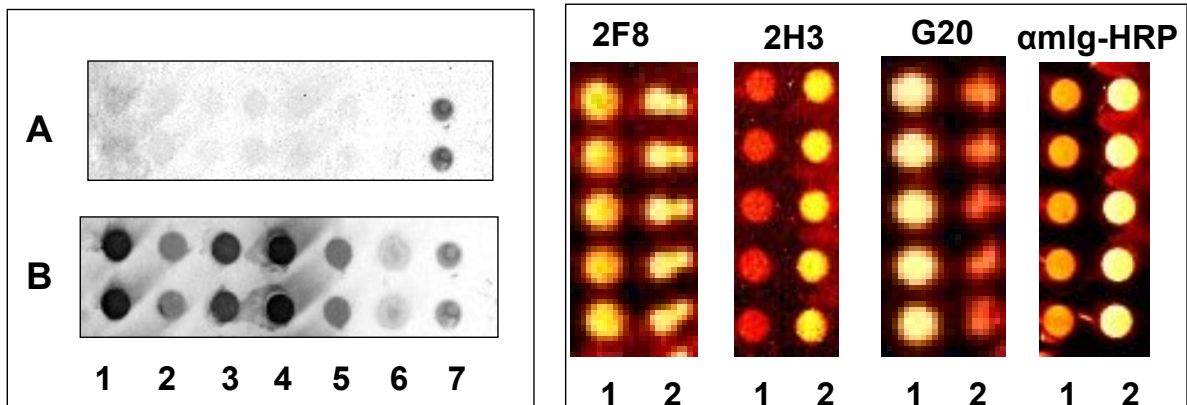


Abbildung 35: Überprüfung verschiedener Spottinglösungen zur Immobilisierung der zum Antigennachweis verwendeten Antikörper auf Aldehyd-aktivierten Slides. Links: mAk FF11/1/6 wurde vor dem Spotten in PBS (1-3) bzw. Bicarbonatpuffer (4-6) verdünnt und mit 30 % Glycerin (2, 5) bzw. 0,5 % Trehalose (3, 6) versetzt. Der so beschichtete Slide wurde dann mit den spezifischen Nachweisreagenzien (A) bzw. peroxidase-markierten Sekundärantikörpern (B) inkubiert. (7 = Kontrollansatz) Rechts: Slides wurden mit mAk zum Nachweis von *C. burnetii* (2F8), *Stx1* (2H3) und *Y. pestis* (G20) verdünnt entweder in PBS (1) oder Bicarbonatpuffer (2) beschichtet und dann mit den jeweiligen Antigenen beprobt. Daneben ist exemplarisch ein mit peroxidase-markierten Sekundärantikörpern inkubierter Kontrollansatz dargestellt.

höhere Immobilisierungsrate (überprüft mittels tierartspezifischer Sekundärantikörper), die Restaktivität der so gebundenen Antikörper lag jedoch in der Regel deutlich unter der von mit PBS gespotteten Vergleichsansätzen (Abb. 35). Weitere Versuche zeigten zudem, dass bei den in Bicarbonatpuffer generierten Spots tendenziell vermehrt unspezifische Reaktionen mit den markierten Nachweisantikörpern auftraten.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Tween20-Zusätzen zur Verdünnungslösung der biotinylierten Nachweisantikörper, der beim Multi-Analyt-System im Mikrotiterplattenformat Probleme verursacht hatte, genauer untersucht. Im Gegensatz zu den in 2.5 beschriebenen Ergebnissen erwies sich im Microarray-Format der Tween-Zusatz als vorteilhaft, da beim Antigen-Nachweis dadurch höhere Spotintensitäten bei gleich bleibender niedriger Hintergrund-Färbung induziert werden konnten (Abb. 36).

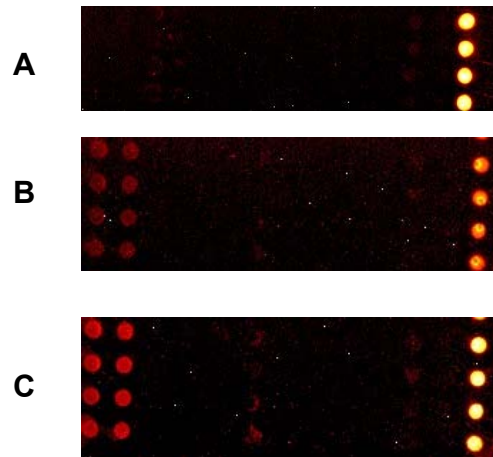


Abbildung 36: Einfluss von Tween-20 Zusätzen zur Nachweisantikörper-Verdünnungslösung auf die Testcharakteristika am Beispiel des Stx2-Nachweises. Mit allen Fangantikörpern (jeweils Doppelreihen, ganz rechts Peroxidase-Kontrolle) beschichtete Aldehyd-Slides wurden (A) nur mit den biotinylierten Nachweisantikörpern (Kontrolle des unspezifischen Hintergrundes) bzw. (B, C) mit Stx2 und allen Nachweisantikörpern beschickt (antigenspezifischer Ansatz). (B) ohne Tween-Zusatz (C) mit Tween-Zusatz

Die Robustheit und Spezifität des auf Aldehyd-aktivierten Slides basierenden Microarrays wurde in sequentiellen Versuchsansätzen überprüft, bei denen ein Biochip in konsekutiven Testzyklen alternierend mit jeweils einem Antigen inkubiert wurde (Abb. 37). Nach insgesamt sechs Testzyklen waren weder eine Abnahme der Spotintensitäten noch Ablagerungen der Nachweisreagenzien (Hintergrundfärbung) auf dem Biochip zu beobachten. Auch ausgeprägte unspezifische Reaktionen der Nachweisantikörper mit antigenfremden Testfeldern traten in diesen Versuchsreihen auch dann nicht auf, wenn die Reihenfolge der Antigen-Zugabe geändert wurde. Bei der Implementierung von polyklonalen, ungereinigten Antiseren, die alternativ getestet wurden, um den Pocken- bzw. Francisellen-Nachweis in diesem Microarray-System zu ermöglichen, traten hingegen massive unspezifische Reaktionen mit den anderen Nachweiskörpern auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem auf Aldehyd-Slides basierenden Microarray ein robustes System zur Verfügung steht, dessen einziger allerdings auch gravierender Nachteil darin besteht, dass manche Antikörper während der Immobilisierungsreaktion inaktiviert werden.

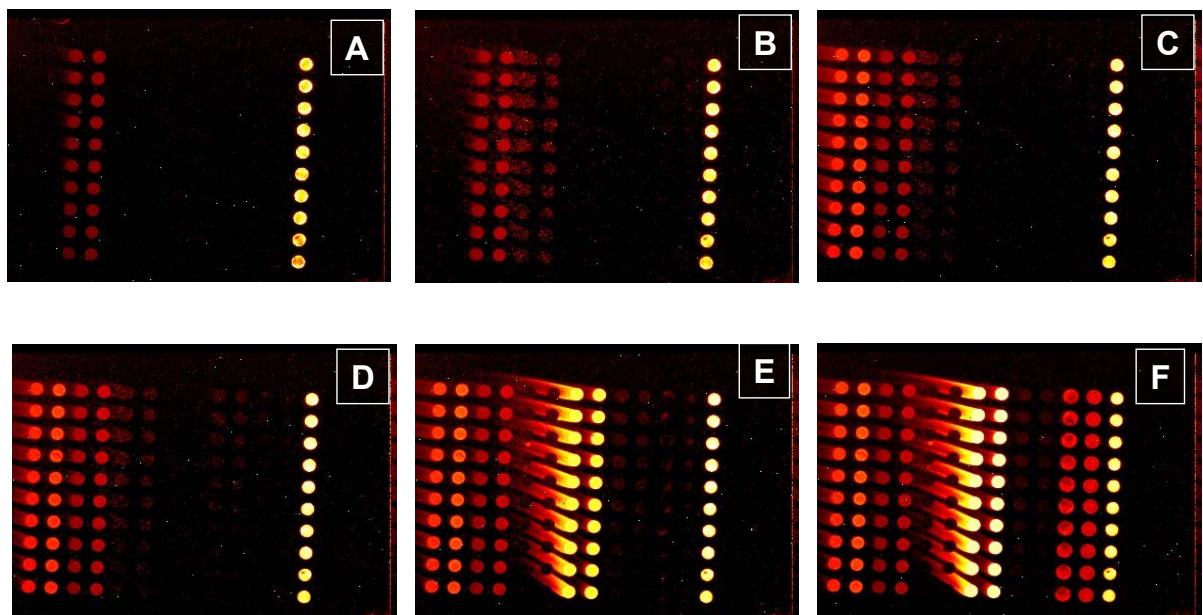


Abbildung 37: Nachweis von Agenzien mittels Microarray-PASA basierend auf Aldehyd-aktivierten Biochips. Sequentieller Nachweis von Stx1(A), *C. burnetii* (B), Stx2 (C), *F. tularensis* (nicht nachweisbar, D) *Y. pestis* (E) und SEB (F) auf einem Slide (zwei Testreihen/Antigen; rechts Kontrollreihe). Für jeden Analyten wurde ein vollständiger, automatisierter Testzyklus (Inkubation mit Antigen, biotinylierten Detektionsantikörpern, ExtrAvidin-HRP und lumineszierendem Substrat, Testdauer 25 min) im PASA-Prototyp gefahren.

3.2.8.2 FAST-Slides

Zum Zeitpunkt dieser detaillierteren Untersuchungen standen für den Nachweis der jeweiligen Analyten neben den biotinylierten bereits auch digoxigenierte Detektionsantikörper zur Verfügung, deren Verwendung im Mikrotiterplattenformat bei den

meisten Testsystemen zu einer deutlichen Verbesserung der Nachweisgrenzen geführt hatte. Auch im auf Fast-Slides basierenden Microarray-System konnten bei Einsatz dieser digoxigenierten Nachweisantikörper höhere Signalintensitäten bei den Einzelnachweisen festgestellt werden. Dies resultierte beispielsweise in einer deutlichen Sensitivitätssteigerung des Francisellen-Nachweises (Abb. 38).

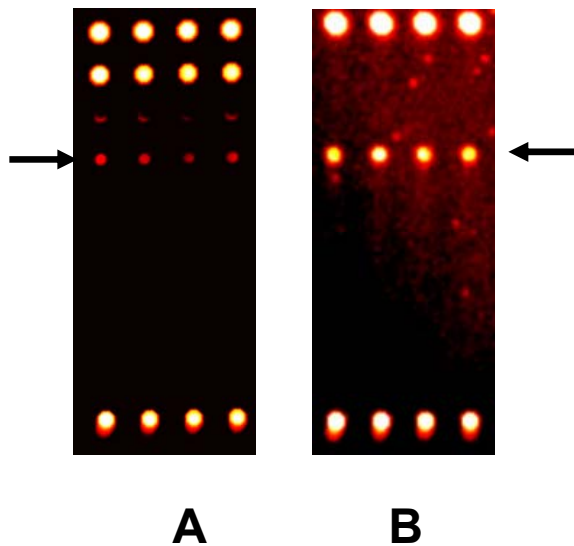


Abbildung 38: Nachweis von *F. tularensis*-Antigenpräparation auf einem FAST-Slide unter Verwendung biotinylierter (A) bzw. digoxigenerter Nachweisantikörper

Dadurch dass zwei komplette Sets an unterschiedlich markierten Nachweisantikörpern zur Verfügung standen eröffneten sich auch weitere Testdesignmöglichkeiten. Vor allem im Hinblick auf die Reduzierung unspezifischer Reaktionen, wie sie beim Digoxigenin-System häufiger auftreten, wurde untersucht, inwieweit durch die Implementierung biotinylierter Antikörper als Fangantikörper eine Reduzierung dieser unspezifischen Anlagerungen erreicht werden kann. Parallel dazu wurden in einer weiteren Variante FAST Slides zuerst über Nacht mit Streptavidin (10 µg/ml PBS) beschichtet und dann mit dem Microarray-Spotter die nicht markierten bzw. biotinylierten Fangantikörper aufgetragen. Als Verdünnungslösung wurde standardmäßig PBS verwendet bzw. die biotinylierten Antikörper lagen in PBS mit Zusatz von 1 % bovinem Serumalbumin vor. Die Konzentrationen der Antikörper bewegten sich im Bereich von 500 µg/ml (nicht markierte Antikörper) bis 950 µg/ml (biotinylierte).

Die Funktionalität der beiden FAST-Slide Varianten, repräsentiert durch nicht vorbehandelte Nitrocellulose [FAST(–)] bzw. den Streptavidin beschichteten Membranen (FAST-STREP),

wurde dann in antigenspezifischen Tests überprüft, wobei zwei verschiedene Antigen-Mischungen verwendet wurden. Eine Mischung bestand aus den inaktivierten Antigenpräparationen von *Y. pestis* bzw. *C. burnetii*, sowie gereinigtes SEB, die andere aus den restlichen Antigenen (*F. tularensis*, Stx1, Stx2 und Orthopocken). Bei allen Ansätzen wurde, unabhängig von der verwendeten Antigenmischung, die vollständige Palette der vorhandenen Nachweisantikörper eingesetzt.

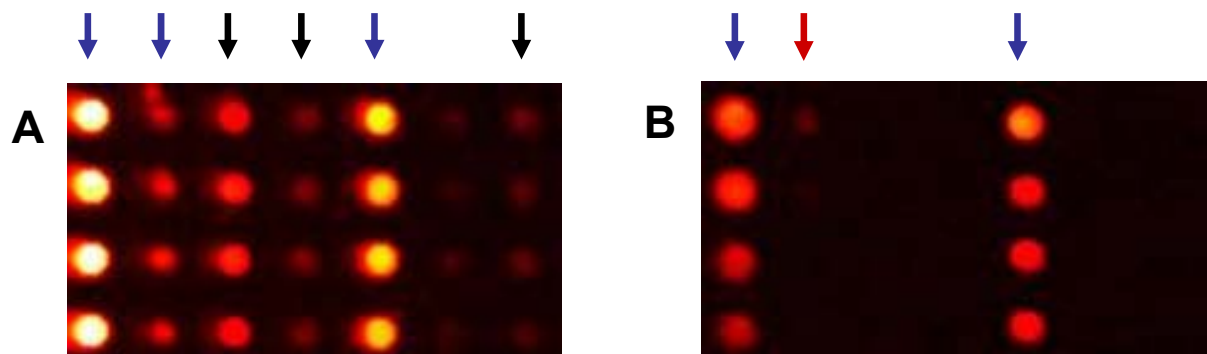


Abbildung 39: Reaktivität einer Antigenmischung (*Y. pestis*, *C. burnetii*, SEB) auf FAST(–)Slides. Zur Beschichtung wurden entweder (A) unmarkierte oder (B) biotinylierte Antikörper verwendet. Antigenspezifische Reaktivitäten sind mit blauem (→), falsch negative mit rotem (→), falsch positive mit schwarzem Pfeil (→) gekennzeichnet.

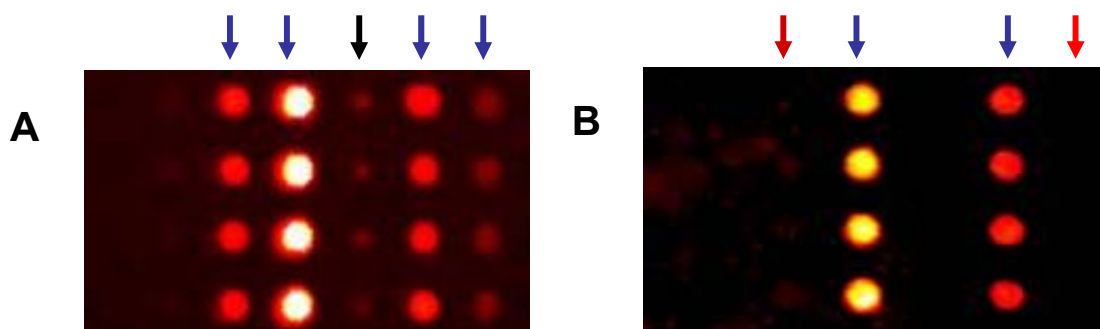


Abbildung 40: Reaktivität einer Antigenmischung (*Stx1*, *Stx2*, *F. tularensis*, Orthopocken) auf FAST(–)Slides. Zur Beschichtung wurden entweder (A) unmarkierte oder (B) biotinylierte Antikörper verwendet. Antigenspezifische Reaktivitäten sind mit blauem (→), falsch negative mit rotem (→), falsch positive mit schwarzem Pfeil (→) gekennzeichnet.

Nach Umstellung des Detektionsprinzips auf digoxigenierte Antikörper wurde vor allem auf FAST(–)Slides bei Beschichtung mit unmarkierten Antikörpern eine ganze Reihe von falsch positiven Ergebnissen erhalten (Abb. 39 und 40), besonders ausgeprägt beim Stx1-Nachweis.

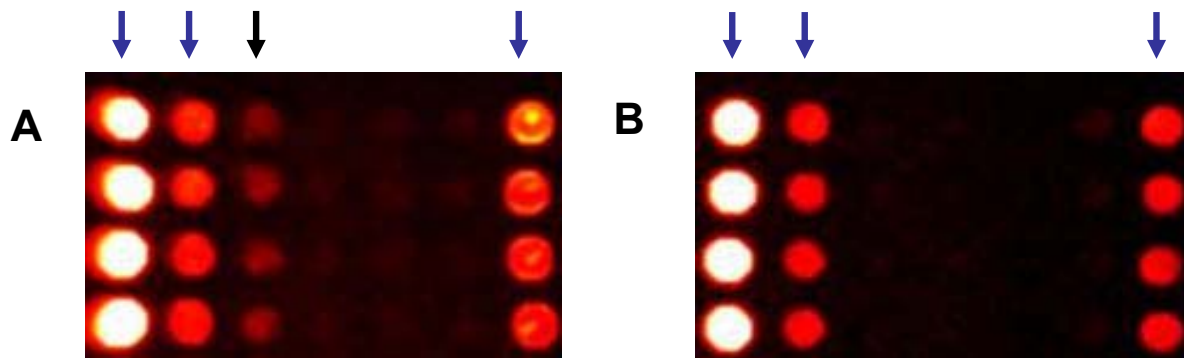


Abbildung 41: *Reaktivität einer Antigenmischung (*Y. pestis*, *C. burnetii*, SEB) auf FAST-STREP Slides. Zur Beschichtung wurden entweder (A) unmarkierte oder (B) biotinylierte Antikörper verwendet. Antigenspezifische Reaktivitäten sind mit blauem (→), falsch negative mit rotem (→), falsch positive mit schwarzem Pfeil (→) gekennzeichnet.*

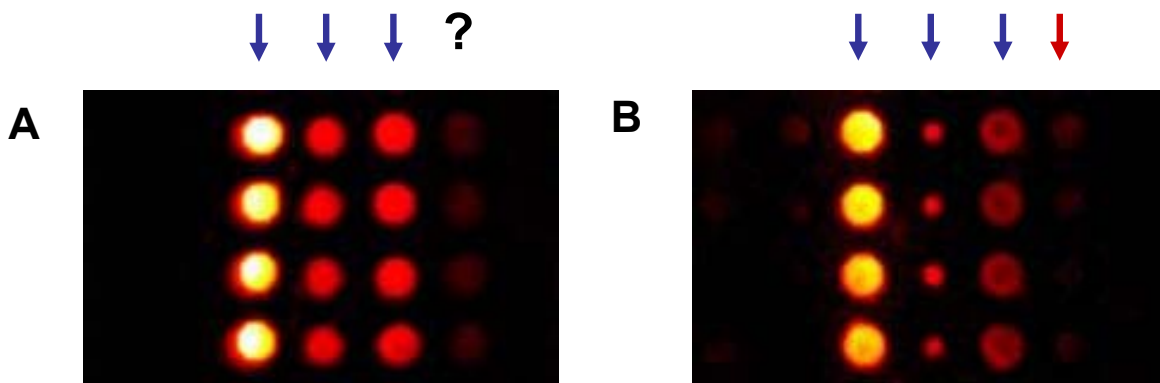


Abbildung 42: *Reaktivität einer Antigenmischung (Stx2, Stx1, *F. tularensis*, Orthopocken) auf FAST-STREP Slides. Zur Beschichtung wurden entweder (A) unmarkierte oder (B) biotinylierte Antikörper verwendet. Antigenspezifische Reaktivitäten sind mit blauem (→), falsch negative mit rotem (→), falsch positive mit schwarzem Pfeil (→) gekennzeichnet.*

Durch den Einsatz von biotinylierten Antikörpern als Beschichtung konnten diese unspezifischen Reaktionen hingegen unterdrückt werden (Abb. 39 B und 40 B), obwohl zum Spotten etwa doppelt so hohe Konzentrationen verwendet worden waren. Andererseits traten bei dieser Variante, die sich im Übrigen auch durch eine niedrigere Hintergrundfärbung auszeichnete, auch einige falsch negative Ergebnisse (Coxiellen, Stx1, Pocken) auf.

Nach Überprüfung verschiedener weiterer Testmodifikationen konnte schließlich durch die Herstellung von Streptavidin-beschichteten FAST-Slides ein deutlich leistungsfähigeres Microarray-System etabliert werden (Abb. 41 und 42). Mit Ausnahme des Orthopocken-Nachweises, mit dem im Übrigen auch bei allen anderen überprüften Testvarianten nur schwach positive Testsignale erhalten wurden, konnten alle eingesetzten B-Agenzien zuverlässig nachgewiesen werden.

Weitere orientierende Untersuchungen zeigten, dass durch die Verwendung alternativer Spottinglösungen bzw. durch weitere Zusätze die Intensitäten von signalschwachen Nachweisen, wie z.B. bei Stx1, gesteigert werden könnte (Abb. 43). Dieser Aspekt konnte jedoch im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr genauer untersucht werden. In Tab. 14 sind die Immobilisierungsbedingungen auf FAST-STREP Slides für die im Rahmen des Forschungsprojektes ausgewählte, sehr heterogene Antikörperpalette zusammengefasst.

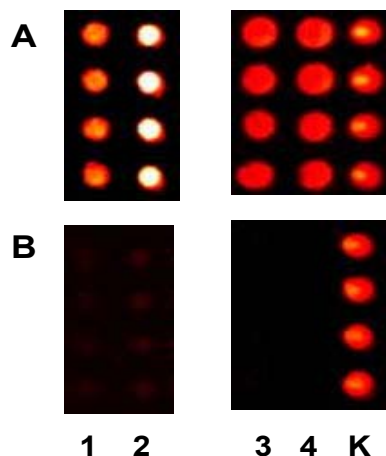


Abbildung 43: Überprüfung alternativer Spottingpuffer für die MAK zum Nachweis von Stx1 (1), *F. tularensis* (2) und *C. burnettii* (3,4). Als Beschichtungspuffer wurde Bicarbonatpuffer (1, 2, 4) bzw. PBS (3) jeweils mit Zusatz von 30 % Glycerin verwendet. Die FAST-STREP-Slides wurden dann mit (A) bzw. ohne (B) Antigen und der kompletten Nachweisantikörper-Palette inkubiert. (K = peroxidasemarkierter Kontrollansatz)

Tabelle 14: Optimierte Bedingungen zur Immobilisierung der Fangantikörper auf den FAST-STREP Biochips

Antikörper- Bezeichnung	Antigen	Immobilisierter Antikörper	möglicheSpotting- puffer-Zusätze
1E1	A Untereinheit von Stx 2	biotinyliert	nicht notwendig
2H3	B Untereinheit von Stx 1	nicht markiert	Glycerin
FF11/1/6	LPS von <i>F. tularensis</i>	nicht markiert	Glycerin
G20	F1 Antigen von <i>Y. pestis</i>	nicht markiert	nicht notwendig
Schaf α -SEB	Enterotoxin B von <i>S. aureus</i>	biotinyliert	nicht notwendig
2F8	somat. Ag von <i>C. burnettii</i>	nicht markiert	Glycerin
5B1	Orthopoxvirus	?	unbekannt

Aufgrund der zwei de facto völlig unterschiedlichen Immobilisierungsprinzipien (Adsorption bzw. Biotin/Streptavidin-System), die beim FAST-STREP zum Tragen kommen, erfüllt dieser Biochip fast vollständig die Anforderungen, die an eine universell einsetzbare Festphase gestellt werden. Dies ist für die zukünftige Implementierung weiterer Nachweisverfahren ein entscheidender Punkt, damit das Potential (kurzfristig bis zu 30 Tests integrierbar) des Biosensors auch ausgeschöpft werden kann.

3.2.8.3 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Zur Adaptation des für die Chemilumineszenz-Detektion etablierten PASA-Testprotokolls auf den Fluoreszenz-Nachweis mussten umfangreiche Modifikationen vorgenommen werden. Eine Absättigung der verwendeten FAST- bzw. Streptavidinbeschichteten Slides erwies sich als unumgänglich, wobei für Messungen im rot-absorbierenden Bereich durch die Verwendung von PBS mit Zusätzen von 3 % Tween und 5 % Saccharose die Hintergrundfluoreszenz auf einen akzeptablen Bereich reduziert werden konnte. Als Antigenverdünnungspuffer wurde Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) mit Zusatz von 0,05 % Tween 20 und 0,1 % BSA verwendet, die markierten Antikörper (2 – 4 µg/ml) wurden in TBS mit Zusatz von 1 % Casein verdünnt. Als Positivkontrolle wurde mit Alexa-488 bzw. Alexa-647 markiertes Streptavidin (20 bzw. 30 µg/ml) verwendet. Die Messung der Slides erfolgte mittels digitalen Imager-Systems.

Wie bereits die EIA-Ergebnisse im Mikrotiterplattenformat angedeutet hatten, konnte durch die Implementierung der fluoreszenzmarkierten Antikörper in den Microarray-Biochip keine Verbesserung der Nachweissystems erreicht werden. Bei antigenspezifischen Tests wurden nur beim Yersinien-, Stx2 und SEB-Nachweis stärkere Signalintensitäten beobachtet (Abb. 44).

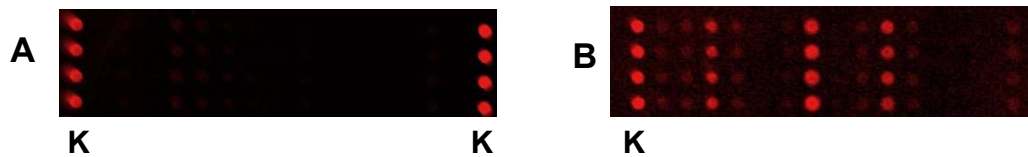


Abbildung 44: Nachweis von B-relevanten Agenzien mittels Microarray unter Verwendung von mit Alexa-647 markierten Nachweisantikörpern. (A) ohne Antigenzusatz (B) mit Antigen (K fluoreszenzmarkierte Kontrollen)

3.2.9 Implementierung von Kontrollansätzen

Um die ordnungsgemäße Durchführung der einzelnen Testschritte zu protokollieren, ist die Integration von aussagekräftigen Kontrollansätzen auf den Microarrays essentiell. Da es sich beim zugrunde liegenden Testprinzip um einen Sandwich-EIA handelt, sollten die Kontrollen sinnvollerweise aus Immunreagenzien bestehen, die nicht mit den antigenspezifischen Nachweisen interferieren. Des Weiteren sollten die durch die Kontrollansätze generierten Signalintensitäten mit denen der Einzelanalyt-Nachweise korrelieren. Unter Berücksichtigung dieser Vorbedingungen wurden im Laufe des Projektes folgende Kontrollansätze für die auf Chemilumineszenz-Detektion basierenden Biochips etabliert:

- peroxidasemarkierte Sekundärantikörper

Üblicherweise wurde dazu α -ms-Ig-HRP (6,5 μ g/ml) verwendet, die eingesetzten Konzentrationen lagen somit um Faktor 100 – 200 niedriger als bei den Analyt-spezifischen Fangantikörpern. Anhand dieses Kontrollansatzes können der ordnungsgemäße Ablauf des Spottings, sowie Zugabe bzw. Aktivität des lumineszierenden Substrates überprüft werden.

- antiidiotypische Antikörper

Mit Hilfe dieses innovativen Kontrollansatzes ist es möglich, nicht nur die Probenzugabe, sondern auch mögliche Probenmatrix-Interferenzen (Hemmung der Antigen-Antikörperreaktion) zu dokumentieren. Basis hierfür ist ein beim Projektnehmer entwickeltes

Antikörper-Pärchen bestehend aus einem haptenspezifischen mAk (7H11) und einem gegen diesen mAk 7H11 gerichteten, hochaffinen antiidiotypischen mAk (1F8). Auf dem Biochip integriert ist der mAk 7H11 (37 µg/ml), der antiidiotypische mAk (markiert mit Biotin bzw. Digoxigenin) wird in Konzentrationen von 125 ng/nl der Probe zugegeben.

- nicht markierte Sekundärantikörper

Im Hinblick auf die Herkunft der Analyt-spezifischen Nachweisantikörper wurden hierfür anti-Maus- und anti-Schaf-IgG vom Kaninchen in Konzentrationen von 15 µg/ml (entspricht 75 fg/Spot) verwendet. Diese Referenzreihen dienen dazu, während des Testablaufs die erfolgte Zugabe der markierten Nachweisantikörper zu dokumentieren.

- haptenmarkierte Antikörper

In Abhängigkeit vom Detektionsprinzip des jeweiligen Testverfahrens werden hierbei entweder biotinylierte (Biotin/ExtrAvidin-Prinzip) oder digoxigenierte Antikörper (Digoxigenin-System) auf dem Biochip integriert. Dadurch kann die ordnungsgemäße Zugabe bzw. die Funktionalität der peroxidasemarkierten Sekundärreagenzien kontrolliert werden.

Somit konnte eine Palette von Kontrollansätzen etabliert werden, die die Dokumentation des gesamten Testablaufs ermöglichen.

3.2.10 Sensitivität der entwickelten Microarray-Verfahren

Zur Überprüfung der Sensitivität wurden die jeweiligen Microarray-Biochips unter optimierten Testbedingungen mit Verdünnungen der in 3.1.3 aufgeführten Antigen-Präparationen inkubiert und danach mittels CCD-Kamera bzw. Imager-System ausgewertet. Die mit den drei überprüften Microarray-Verfahren (Chemilumineszenz-Detektion auf Aldehyd-aktivierten bzw. mit Nitrocellulose beschichteten Slides, sowie Fluoreszenz-Nachweis) ermittelten Nachweisgrenzen sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Nachweisbarkeit von Antigenpräparationen der Model-Agenzien mit verschiedenen Microarray-Systemen

Antigenpräparation	Chemilumineszenz		Fluoreszenz ¹
	Aldehyd-aktivierte Slides ²	FAST-Slides ³	
<i>Y. pestis</i>	1:20.000	>1:50.000	1:2.500
<i>C. burnetii</i>	1:30.000	> 1:2.000	1:200
<i>F. tularensis</i>	n.n.	> 1:2.000	1:50
Stx 1	5 ng/ml	> 1:100 ⁴	1:10 ⁴
Stx 2	1: 20.000	> 1:10.000	1:200
SEB	0,75 ng/ml	<<1 ng/ml	< 10 ng/ml

(1) Detektionsantikörper mit Alexa-647 markiert; (2) Verwendung biotinylierter Nachweisantikörper; (3) Verwendung digoxigenierter Nachweisantikörper (4) Toxoid-Präparation; n.n.: nicht nachweisbar

Im Vergleich zu den entsprechenden EIA-Verfahren im Mikrotiterplattenformat (Tab. 10) war erwartungsgemäß bei allen drei Microarray-Formaten ein deutlicher Empfindlichkeitsverlust zu konstatieren (Faktor 10 -100). Trotzdem zählen die im Rahmen des Projektes entwickelten, auf Chemilumineszenz basierenden Biochips zu den empfindlichsten bislang beschriebenen Schnelldiagnostikverfahren.

Auch wenn nicht bei allen Verfahren für jedes Antigen der Endpunkttiter bestimmt wurde, ist zwischen den verschiedenen Microarray-Formaten doch eine einheitliche Tendenz zu erkennen. Die für die Fluoreszenz-Nachweise erhaltenen Nachweisgrenzen verdeutlichen nochmals, dass bei immunchemischen Verfahren zumindest mit den gegenwärtig kommerziell verfügbaren Fluorochromen keine der Chemilumineszenz vergleichbare Sensitivität erreicht werden kann. Auch die durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sekundärreagenzien, wie beispielsweise markiertes Streptavidin, mögliche Verbesserung des Testsystems würde bei weitem nicht ausreichen, die auf den fehlenden Multiplikationsschritt zurückzuführenden Sensitivitätsverluste (Faktor 20 – 100) auszugleichen.

Beim Vergleich der auf Chemilumineszenz-Detektion basierenden Microarrays konnten die im Mikrotiterplattenformat erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Das Digoxigenin-System erwies sich nach Adaption an die Nitrocellulose-beschichteten Biochips dem Biotin/ExtrAvidin-System als überlegen. Unter Berücksichtigung der den bakteriellen Antigenpräparationen zugrunde liegenden Keimgehalte liegen die Nachweisgrenzen der beiden Microarray-Verfahren bei etwa $10^5 - 10^7$ KbE/ml, gereinigte Toxine konnten im unteren ng-Bereich zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Dies stellen Bereiche dar, die für die Schnell Diagnostik von B-Agenzien auf A/B-Level entsprechend den Richtlinien der CDC (CDC, 2000) als zufriedenstellend angesehen werden können.

4 DISKUSSION

Die Multi-Analytfähigkeit und Schnelligkeit von analytischen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen und deren Toxinen ist ein Thema, dass seit langem intensiv diskutiert wird und bei dem im Laufe der Jahre eine Vielzahl verschiedenste Ansätze vorgestellt wurden. Dies gilt insbesondere zum einen für die Überwachung von Lebensmitteln, zum anderen aber auch für die Analytik von Umwelt- und klinischen Proben, da seit 2001 die versehentliche oder absichtliche Freisetzung von sog. biologischen Agenzien wieder verstärkt als Bedrohung empfunden wird. Um eine mögliche Exposition rechtzeitig zu erkennen, sind empfindliche und schnelle Nachweisverfahren für eine sichere Diagnosestellung unerlässlich. Durch die Einführung der Microarray-Technologie eröffneten sich in dieser Hinsicht neue Möglichkeiten, wurden bislang jedoch fast exklusiv für DNA-/RNA-Assays verwirklicht.

Im Lauf der letzten Jahre wurden zwar viele verschiedene Varianten an Biosensoren beschrieben, die meisten befinden sich jedoch noch im Stadium der Grundlagenforschung und -entwicklung, wie z.B. massensensitive Echtzeit-Immunosensoren auf der Basis von Piezoquarzen (BEN-DOV et al., 1997) und ähnliche Systeme (PYUN et al., 1998). Zum Nachweis von B-Agenzien allerdings sind im Hinblick auf einen schnellen Nachweis, einer hohen Testsensitivität und geringen Störanfälligkeit optische Systeme unter Verwendung von markierten Reagenzien am aussichtsreichsten (ROWE et al., 1999). Der entscheidende Nachteil dieser Systeme bestand jedoch oftmals in der fehlenden bzw. limitierten Multianalytfähigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen in einer Pilotstudie überprüft, inwieweit durch Kombination des klassischen Sandwich-EIA Prinzips mit der Microarray-Technologie der schnelle Parallelnachweis verschiedener Mikroorganismen und mikrobieller Toxine realisierbar ist.

4.1 Erstellung eines uniformen Testsablaufs

Bedingt durch die limitierte Verfügbarkeit von hochaffinen Antikörpern beschränkten sich die Arbeiten zur Optimierung der Einzeltests und der Erstellung eines uniformen Testablaufs – essentielle Voraussetzung zur Implementierung der Nachweisverfahren in den Biosensor - auf

den Nachweis von Orthopoxvirus, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, sowie den mikrobiellen Toxinen Shigatoxin 1 bzw. 2 und Staphylokokken-Enterotoxin B. Aufgrund der höheren Spezifität und Sensitivität gegenüber anderen nicht-kompetitiven Immunoassays konzentrierten sich hierbei die Arbeiten auf die Etablierung von Sandwich-EIA's, ein Testformat das die aufgrund seiner nach MAC BEATH (2001) systemimmanenten Vorteile, die auf Antikörpern basierende Microarray-Diagnostik in Zukunft dominieren wird. Die Etablierung erforderte die Herstellung markierter primärer Antikörper, wobei sowohl die direkte Markierung mit Peroxidase als auch eine Markierung mit Biotin (Nachweis mit Streptavidin- bzw. ExtrAvidin-HRP) übliche Verfahren darstellen. Die Verwendung biotinylierter Antikörper resultiert meist aufgrund der hohen Affinität des Streptavidins in einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit der Sandwich-EIAs (GIJLSWIJK, 1996). Das konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel des SEB-, sowie des Stx2-Nachweises demonstriert werden. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung haptenmarkierter Antikörper liegt darin, dass nur ein enzymmarkiertes Nachweisreagens zur Detektion gebundener Antikörper benötigt wird. Dies bietet im Hinblick auf die Etablierung eines Microarray-Systems substantielle Vorteile, da bei Verwendung einer Vielzahl von enzymmarkierten Primärantikörpern in einem Testsystem häufig Komplikationen (unspezifische Background-Reaktionen) aufgrund der hohen absoluten Konzentration an Peroxidase auftreten (EKINS et al., 1992). Alternativ zur Biotinylierung wurden die zum Antigennachweis eingesetzten Antikörper auch mit Digoxigenin markiert. Dadurch eröffneten sich für die Implementierung der Nachweisverfahren in das PASA-Sensorformat weitere methodische Möglichkeiten, insbesondere im Hinblick auf die Verwendung Streptavidin-beschichteter Microarrays, die sich in einer ganzen Reihe von Publikationen bewährt hatten (DELEHANTY und LIGLER, 2002; HÖSEL et al., 2004; ROWE. et al., 1999;).

In einer systematischen und zeitaufwendigen Studie wurden diese Markierungsreaktionen für jeden einzelnen Antikörper anhand von verschiedenen Kopplungsansätzen optimiert. Dass dieser Aufwand gerechtfertigt war, ist daran zu erkennen, dass bei jedem der überprüften sieben Nachweissysteme deutliche Effekte in Abhängigkeit von der Markierungsdichte des Nachweisantikörpers auftraten. Besonders eindrucksvoll zeigte sich dies beim Francisellen-Nachweis, bei dem - je nachdem welche Biotinylierungsvariante verwendet wurde - die Nachweisempfindlichkeit um bis zu Faktor 100 variierte. Überraschenderweise konnte zudem bei fast allen Nachweissystemen durch den Einsatz der digoxigenierten Antikörper eine deutliche Steigerung der Sensitivität induziert werden. Hierbei zeigte sich auch

interessanterweise, dass in der Regel die Konjugate, die nach dem vom Hersteller empfohlenen molekularen Kopplungsverhältnis (1:70) von Hapten:Antikörper hergestellt worden waren, eine geringere Reaktivität aufwiesen als die alternativ überprüften Ansätze. Offensichtlich wurde bislang das Potential dieses Markierungsverfahren, das v. a. in der Nukleinsäurediagnostik (YANAGISAWA et al., 2004) weit verbreitet ist bzw. auch in der Immunhistochemie (SCHUTZ et al., 1999) häufig eingesetzt wird, für EIA-Verfahren unterschätzt. Bei der weiteren Optimierung der Testverfahren wurde insbesondere der Einfluss von Detergenzien-Zusätzen überprüft. Da die Mehrzahl der mit den jeweiligen Systemen nachgewiesenen Antigene, wie z.B. F1-Antigen von *Y. pestis* oder die mikrobiellen Toxine, hydrophobe Eigenschaften aufweisen, wurden insbesondere entsprechende Zusätze zu den Antigenverdünnungspuffern untersucht. Bei den meisten Nachweissystemen, besonders ausgeprägt beim Yersinien-, Coxiellen- und SEB-Nachweis, konnte dadurch eine weitere Steigerung der Nachweisempfindlichkeiten induziert werden.

Insgesamt gesehen, gehören die nach Optimierung der verschiedenen Parameter etablierten Testsysteme zu den sensitivsten bislang beschriebenen klassischen EIA-Verfahren. Die Nachweisbarkeit der mikrobiellen Toxine lagen im unteren pg-Bereich, für die bakteriellen Testverfahren konnten Nachweisgrenzen im Bereich von 10^3 KbE/ml realisiert werden. Wie erwartet (MACBEATH, 2002), erwiesen sich die auf fluoreszenzmarkierten Nachweisantikörpern beruhenden Testsysteme aufgrund des fehlenden Multiplikationsschrittes als deutlich weniger sensitiv.

4.2 Etablierung von Microarray-Verfahren

Die entscheidenden Schwierigkeiten beim Transfer der in Mikrotiterplatten optimierten Enzymimmuntests auf ein Microarray-Format liegen im Verlust der biologischen Aktivität während der Immobilisierung, im Auftreten von unspezifischen Background-Signalen, sowie dem Bleaching-out der Antikörper. So berichteten z.B. SCHWEIZER et al. (2002) über massive Probleme, die dazu führten, dass etwa die Hälfte der implementierten Immunreagenzien (37 monoklonale Antikörper bzw. polyklonale Antiseren gegen Zytokine) durch alternative Produkte ersetzt werden musste. Diese breite Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen Antikörpern ist auch der Grund, dass die meisten bislang

publizierten Microarrays, die auf dem Prinzip des Sandwich-EIAs basieren, zum Nachweis von Zytokinen entwickelt wurden (KUSNEZOW et al., 2003). Bei anderen Analyten ist hingegen die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern limitiert, v. a. auch unter dem Aspekt, dass Wahrscheinlich prinzipiell nur 5% der Antikörper für den Einsatz in Microarray-Systeme geeignet sind (MACBEATH, 2002). Trotz der oftmals bemängelten Stabilität stellen Antikörper aufgrund ihrer Spezifität und Affinität nach wie vor das Mittel der Wahl zur Erstellung von analytischen Arrays dar (CUTLER, 2003). Alternative Liganden wie aus Genbibliotheken gewonnene, rekombinante Antikörper, synthetische Peptide, peptidomimetische Verbindungen oder Aptamere weisen üblicherweise nicht die geforderten Affinitäten auf, um hochsensitive Nachweisverfahren zu erstellen (KODADEK, 2002).

In zahlreichen bislang publizierten Untersuchungen (für eine Übersicht siehe 2.3) wurde daher überprüft, ob durch den Einsatz spezieller Microarray-Oberflächen oder spezifischer Immobilisierungsbedingungen die Problematik der Antikörperinstabilität zu umgehen ist. Auch in den eigenen Untersuchungen wurde eine ganze Reihe unterschiedlicher Microarray-Oberflächen, angefangen mit unterschiedlich aktivierten Glasslides (Epoxid-, bzw. Aldehyd-), über chemisch-modifizierte Polyacrylimid-Gele (Hydrogele) bis zu Nitrozellulosebeschichteten Slides (FAST-Slides) überprüft. Alle eingesetzten Oberflächen erwiesen sich prinzipiell als geeignet zur Etablierung eines Microarrays, zeigten jedoch auch z. T. die bekannten gravierenden Nachteile. So resultierte die Verwendung Epoxid- bzw. Aldehyd aktivierter Slides, bei denen die kovalente Kopplung der Antikörper rein zufällig über primäre Aminogruppen erfolgt, teilweise in einer Inaktivierung der Antikörper (besonders ausgeprägt beim Francisellen-Nachweis). Zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten propagierten u. a. PELUSO et al. (2003) die gerichtete Kopplung der Antikörper über den Kohlenhydratanteil des Fc-Anteils bzw. über die Sulfhydrylgruppen von Fab-Fragmenten. Dieses Vorgehen wurde allerdings nur anhand von drei mAk gegen Zytokine demonstriert, die auch bei Verwendung zufälliger Kopplungsverfahren aktiv blieben. Nicht berücksichtigt wurde, dass bekanntermaßen ein großer Teil der mAk durch den für die Fab-Herstellung notwendigen Pepsin-Verdau inaktiviert wird (PETERS und BAUMGARTEN, 1990) bzw. dass ein gewisser Prozentsatz der mAk nicht glykosyliert ist. Dies konnte z.B. in den eigenen Untersuchungen auch für den zum Coxiellen-Nachweis verwendeten mAk 2F8 gezeigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Abgesehen davon wurden, ähnlich wie bei den oben beschriebenen Markierungsreaktionen, für die bei den jeweiligen Antikörpern optimalen

Oxidationsbedingungen (Zeit, pH-Wert, Perjodat-Konzentrationen) eine große Schwankungsbreite gefunden (WOLFE und HAGE, 1995).

Prinzipiell weist die kovalente Kopplung der Immunreagenzien an die Microarray-Oberflächen eine ganze Reihe von Vorteilen gegenüber den anderen gängigen Immobilisierungsverfahren auf (LI et al., 2003). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass inzwischen eine ganze Reihe von solchen Microarrays basierend auf dem Prinzip des indirekten EIAs etabliert werden konnte (KNECHT et al., 2004; FALL et al., 2003; WINKLMAIR et al., 1999; WELLER et al., 1999), weist eine von MELNYK et al. (2002) vorgestellte Microarray-Variante interessante Aspekte auf. Hierbei wurden kurzkettige und damit stabile Peptide, die das für die Antikörperbindung relevante Antigen-Epitop repräsentierten, kovalent an Microarrays gekoppelt. Dadurch kann die Inaktivierungsproblematik umgangen werden, der Analyt-Nachweis erfolgt hier in einem kompetitiven Ansatz. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass zum einen bei den eingesetzten Antikörpern das Bindungsepitop bekannt ist, zum anderen könnte ein solches System nur bei gegen Proteine gerichteten Antikörpern eingesetzt werden. Die grundsätzlichen Vorteile der kovalent bindenden Microarray-Oberflächen zeigten sich auch in den eigenen Untersuchungen. In Versuchsreihen, in denen Biochips alternierend mit einem Antigen beprobt wurden, konnten auch nach sechs Testzyklen unter den rigiden Bedingungen einer automatisierten Testdurchführung keine Hinweise auf ein Bleaching-out der Fangantikörper gefunden werden. Solch stabile Festphasen könnten – geeignete Regenerationsbedingungen vorausgesetzt – auch eine Wiederverwendbarkeit der Chips ermöglichen. Entsprechende Untersuchungen wurden allerdings nicht durchgeführt.

Der Einsatz von Hydrogelen, die lt. Herstellerangaben die Immobilisierung höherer Proteinkonzentrationen aufgrund der 3-D Struktur der Matrix ermöglichen und durch die wässrige Umgebung die funktionelle Aktivität der Antikörper erhalten sollen, bewährte sich im Gegensatz zu anderen Publikationen (ANGENENDT et al., 2002; ARENKOV et al., 2000; RUBINA et al., 2003; KIYONAKA et al., 2004) in den eigenen Untersuchungen nicht. Es zeigte sich, dass die 3D-Struktur der Festphase dazu führt, dass zur Reduzierung des Backgrounds zeitintensive und ausgiebige Waschschrte nötig waren. Bei vergleichbaren Untersuchungen anderer Autoren, die ebenfalls Gel-beschichtete Oberflächen verwendeten, erfolgten die Inkubationsschritte nicht unter automatisierten Bedingungen, z. T. wurde für die extensiven Waschschrte sogar über Nacht inkubiert (RUBINA et al. 2003).

Bei den anderen überprüften Microarray-Oberflächen, bei denen die Bindung der als Fänger eingesetzten Immunreagenzien adsorptiv erfolgt, standen hingegen die beiden anderen oben erwähnten Problematiken, nämlich das Bleaching-out bzw. unspezifische Bindungen der Antikörper im Vordergrund. Insbesondere die Chips mit modifizierten Polystyrol-Oberflächen reagierten äußerst empfindlich auf die im Biosensor vorherrschenden Strömungsbedingungen. Wurden diese Chips jedoch off-line in Objektträgern inkubiert, wurden wie auch von anderen Autoren berichtet (WILLATS et al., 2002) deutlich bessere Ergebnisse erhalten. Weitaus weniger empfindlich gegenüber den rigiden Durchflussbedingungen zeigten sich die auf einer Nitrocellulose-Membran basierenden FAST-Slides, auf denen im übrigen für alle überprüften sieben Testsysteme antigenspezifische Signale erhalten werden konnten. Eine Inaktivierung der Antikörper trat somit nicht auf. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass diese membranbasierte Biochips ein ausgezeichnetes Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen (LI und REICHERT, 2003; ANGENENDT et al., 2003b) und zudem die Immobilisierung größerer Antikörpermengen als die Glasslides ermöglichen. (KUSNEZOW et al., 2003; LI et al., 2003).

Allerdings traten während der Etablierung dieses Microarrays - insbesondere bei Verwendung der digoxigenierten Antikörper – vermehrt unspezifische Bindungen auf. Diese Problematik konnte durch weitere Testmodifikationen, insbesondere durch den Einsatz einer Festphase bestehend aus Streptavidin und (biotinylierten) Antikörpern (FAST-STREP Slides) weitgehend beseitigt werden. Aufgrund der zwei de facto völlig unterschiedlichen Immobilisierungsprinzipien (Adsorption bzw. Biotin/Streptavidin-System), die beim FAST-STREP zum Tragen kommen, erfüllt dieser Biochip fast vollständig die Anforderungen, die an eine universell einsetzbare Festphase gestellt werden (ANGENENDT et al., 2002). Dies ist insbesondere für die zukünftige Implementierung weiterer Nachweisverfahren bedeutsam, um das Potential (kurzfristig bis zu 30 Tests integrierbar) des Biosensors auch ausschöpfen zu können. Vergleichbare Systeme wurden bislang nicht beschrieben, jedoch gibt es eine ganze Reihe von Arbeiten zur Verwendung von kovalent an Glas-Slides gebundenem Streptavidin bzw. den Einsatz anderer, immobilisierter biotin-bindender Analoga (Avidin, NeutrAvidin) (BHATIA et al., 1989; LIGLER et al., 1991; BOUTELL et al., 2004)).

Eines dieser Systeme, bei dem Neutravidin (2 mg/ml) auf silanisierten Glasslides immobilisiert wird, ist ein von der Arbeitsgruppe um Ligler am Naval Research Laboratory seit Jahren mehrfach modifizierter Immunosensor zum Nachweis von B-Agenzien (ROWE-TAITT et al., 1999), der im wesentlichen auf dem Sandwich-EIA Prinzip mit Fluoreszenz-Detektion beruht. Dieses System ist zwar inzwischen in der Lage bis zu neun Analyten auf

einer Plattform nachzuweisen (ROWE-TAITT et al., 2002), erfordert jedoch eine umfangreiche Fluidik (max. drei Nachweisantikörper werden pro Kanal parallel appliziert), ist nicht automatisierbar und besitzt keine integrierte Detektionseinheit. Da die Tests im Wesentlichen auf polyklonalen Antikörpern basieren, treten zudem Probleme mit unspezifischem Background auf. Die Testdauer beträgt 15 min, jedoch ist hierbei nicht berücksichtigt, dass anschließend noch eine Trocknung der Slides, sowie der eigentliche Detektionsschritt außerhalb der Sensoreinheit erfolgt. Bei den eigenen Untersuchungen wurden Testzeiten (inklusive Detektionsschritt) von 25 min realisiert. Ein Vergleich der Sensitivität der beiden Verfahren ist nur limitiert möglich, da größtenteils ein unterschiedliches Analytenspektrum untersucht wurde. Für SEB lagen die von ROWE-TAITT et al. (2002) angegebenen Nachweisgrenzen bei 10 ng/l, nach Umstellung des Verfahrens auf ein Microarray-Format (DELEHANTY und LIGLER, 2002) konnten noch 4 ng/ml nachgewiesen werden. Ähnliche Größenordnungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung der fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert werden, die auf Chemilumineszenz basierenden Microarray-Formate waren hingegen in der Lage weniger als 1 ng SEB/ml nachzuweisen.

Im Hinblick auf die Sensitivität konnten prinzipiell bei den in dieser Arbeit verwirklichten verschiedenen Microarray-Formaten auch bei den anderen Analyten eine ähnliche Tendenz festgestellt werden. Auch wenn nicht bei allen Verfahren für jedes Antigen der Endpunkttiter bestimmt wurde, verdeutlichen die für die Fluoreszenz-Nachweise erhaltenen Nachweisgrenzen, dass bei immunchemischen Verfahren zumindest mit den gegenwärtig kommerziell verfügbaren Fluorochromen keine der Chemilumineszenz vergleichbare Sensitivität erreicht werden kann. Auch die durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sekundärreagenzien, wie beispielsweise markiertes Streptavidin, mögliche Verbesserung des Testsystems würde nicht ausreichen, die auf den fehlenden Multiplikationsschritt zurückzuführenden Sensitivitätsverluste (Faktor 20–100) auszugleichen.

Die anderen im Rahmen der Arbeit überprüften Microarray-Parameter, wie z.B. Verwendung anderer Spotting-Puffer, Verdünnungslösungen etc., hatten im Vergleich zur zentralen Bedeutung der Selektion von geeigneten Biochip-Oberflächen, nur einen relativ geringen Einfluss auf die Ergebnisse. Alternative Spottingpuffer erwiesen sich nur bei einzelnen Nachweistests als vorteilhaft, eine generelle Verbesserung der Immobilisierungsraten wie sie von DELEHANTY und LIGLER (2003) bei Verwendung von niedermolarem PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA erzielt wurde, konnte hingegen mit keinem der überprüften Puffersysteme

erreicht werden. Auch der von verschiedenen Autoren (ANGENENDT et al. 2003b; KUSNEZOW et al., 2003) berichtete positive Effekt eines Absättigungsschrittes auf die Signalintensität bzw. Reduzierung des Hintergrundrauschens wurde in den eigenen Untersuchungen nicht verifiziert. Dies könnte allerdings auf die automatisierte Testdurchführung zurückzuführen sein, da hierbei durch das Design der Flusszelle die Effektivität der Waschschriffe im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Inkubationsbedingungen deutlich verstärkt wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Modellstudie die grundsätzliche Machbarkeit eines Multi-Analyt-Biosensors anhand einer heterogenen Gruppe von Nachweisverfahren demonstriert werden konnte. Die erfolgreiche Etablierung eines breit einsetzbaren Microarray-Verfahrens sollte es zudem zukünftig ermöglichen, in relativ kurzer Zeit weitere Nachweise auf dem Biochip zu integrieren bzw. das Testsystem an geänderte Fragestellungen anzupassen. Um allerdings das Potential dieses Verfahrens objektiv einschätzen zu können, müssen erst in weiterführenden Versuchen bislang noch offene Fragen, wie beispielsweise der Langzeitstabilität der Biochips oder die Robustheit der Analysen bei Untersuchung von Realproben geklärt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, durch Kombination des klassischen Sandwich-EIA-Prinzips mit der neuartigen Microarray-Technologie einen Parallelen Affinitätssensor-Array (PASA) zu entwickeln, der den schnellen, parallelen und automatisierbaren Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen (*Y. pestis*, *F. tularensis*, *C. burnetii*, Shigatoxine 1 und 2, Staphylokokken-Enterotoxin B und Orthopoxvirus) ermöglicht.

Die Basis dieses Biosensors bildet ein planarer Biochip im Objektträgerformat, auf dem die unterschiedlichen Tests parallel ablaufen. Der Nachweis basiert auf spezifischen Antikörpern, die kovalent oder adsorptiv an die Chipoberfläche gebunden sind, die weiteren Inkubationsschritte eines klassischen Sandwich-EIA's werden in eine Durchflußzelle übertragen, wobei die Zuführung der Reagenzien automatisch über Pumpen erfolgt

Zur Implementierung der Nachweisverfahren in den PASA wurden mittels klassischer EIA-Verfahren alle Einzeltests optimiert und an einen uniformen Testablauf angepasst. Im Hinblick auf die Sensitivität wurde für alle Einzelnachweise das Biotin/ExtrAvidin, das Digoxigenin/Anti-Digoxigenin sowie ein auf Fluoreszenz basierendes Detektionsprinzip etabliert. Als sensitivstes Verfahren erwiesen sich die auf digoxigenierten Nachweisantikörpern basierenden Testsysteme. Die Nachweisgrenzen der optimierten EIA's lagen für die bakteriellen Nachweise im Bereich von 10^3 - 10^4 KbE/ml, die mikrobiellen Toxine konnten im pg-Bereich nachgewiesen werden.

Beim Transfer der im Mikrotiterplattenformat optimierten Testverfahren auf Microarray-Biochips wurde eine breite Palette unterschiedlicher Microarray-Oberflächen untersucht. Als problematisch erwies sich der Verlust der immunologischen Aktivität während der Immobilisierung der Antikörper auf kovalent bindende Festphasen, sowie „Bleaching out“-Effekte bei Verwendung adsorptiver Oberflächen. Auch der Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper bewährte sich nicht. Zwei Microarray-Verfahren, die die für die Etablierung eines automatisierten Schnellnachweises notwendigen Voraussetzungen erfüllten, wurden optimiert und deren Robustheit überprüft. Mit den beiden Microarray-Verfahren konnten Bakterien im Bereich von etwa 10^5 – 10^7 KbE/ml, gereinigte Toxine im unteren ng-Bereich zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Testzeit lag bei 25 min. Damit zählen die im Rahmen des Projektes entwickelten, auf Chemilumineszenz basierenden Biochips zu den empfindlichsten bislang beschriebenen Schnellnachweisverfahren.

Summary

Development of a biosensor for the simultaneous detection of microorganisms and toxins

This project aimed at the development of a novel test system (parallel affinity sensor array, PASA) enabling the rapid, parallel and automated detection of microorganisms and toxins (*Y. pestis*, *F. tularensis*, *C. burnetii*, shigatoxins 1 und 2, Staphylococcal enterotoxin B und orthopoxvirus). For this purpose the classical sandwich-EIA principle was combined with the innovative microarray technology.

The core of the biosensor is a planar biochip represented by a modified microscope slide on which the different tests run in parallel. The detection is enabled by specific antibodies attached to the slides surface by covalent or adsorptive binding. All further incubation steps are performed in a flow-through cell, reagents are automatically supplied by computer controlled pumps.

With respect to the implementation of the detection methods in the PASA system each single-analyte assay was optimized by using classical EIA techniques and then adapted to a uniform test procedure. To enhance assay sensitivity the Biotin/ExtrAvidin, the Digoxigenin/anti-digoxigenin and partially fluorescence detection methods were checked. The most sensitive assays could be established by using detection antibodies labelled with digoxigenin. The detection limits of the optimized assays were in the range of 10^3 - 10^4 cfu/ml, microbial toxins could be detected at the pg-level.

For transferring these optimized assays from microtiter plates to the biosensor platform a broad range of different biochip surfaces were tested. With some of the tested materials major problems encountered either due to inactivation of the antibodies during the immobilization on covalently binding solid phases or due to bleaching-out of antibody-coated adsorptive surfaces. The use of antibodies labelled with fluorochromes proved to be a failure. Two chemiluminescent microarray tests which complied with the basic requirements adherent to the establishment of an automated rapid detection method were further optimized and evaluated for robustness. Both assays enabled the reliable and reproducible detection of bacteria (10^5 – 10^7 cfu/ml) and purified toxins (lower ng-range) within 25 min. Thus, these microarrays rank among the most sensitive rapid tests described so far.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ANGENEND, P., J. GLÖKLER, D. MURPHY, H. LEHRACH, UND D. CAHILL (2002):

Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials

Anal. Biochem. 309, 253-260

ANGENENDT, P., J. GLÖKLER, Z. KONTHUR, H. LEHRACH, UND D. CAHILL (2003A):

3D Protein microarrays: performing multiplex immunoassays on a single chip

Anal. Chem. 75, 4368-4372

ANGENENDT, P., J. GLÖKLER, J. SOBEK, H. LEHRACH UND D. CAHILL (2003B):

Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications

J. Chromatogr. A 1009, 97-104

ARENKOV, P., A. KUKHTIN, A. GEMMELL, S. VOLOSHCHUK, V. CHUPEEVA UND A. MIRZABEKOV (2000):

Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions

Anal. Biochem. 278, 123-131

BEN-DOV, I. UND I. WILLNER (1997):

Piezoelectric Immunosensors for urine specimens of *Chlamydia trachomatis* employing quartz crystal microbalance microgravimetric analyses

Anal. Chem. 69, 3506-3512

BHATIA, S. K., L. C. PROIR, K. J. GEORGER, J. H. CALVERT, J. M. BREDEHORST UND L. LIGLER (1989):

Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces

Anal. Biochem. 178, (2): 408-413

BOSSI, P., A. TEGNELL, A. BAKA, F. VAN LOOCK, J. HENDRIKS, A. WERNER, H. MAISHOF UND G. GOUVRAS (2004)

Bichat GUIDELines for the clinical management of B-Agents

Eurosurveillance 9, (12)

<http://www.eurosurveillance.org>

BOUTELL J. M., D. J. HART, B. L. J. GODBER, R. Z. KOZLOWSKI, UND J. M. BLACKBURN (2004)

Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants

Proteomics 4, 1950-1958

BRANDIS, H., UND H. J. OTTE (1984):

Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 5. Auflage, pp. 489, 360-366, 619-622

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

BUSCHMANN, V., K. D. WESTON UND M. SAUER (2003)

Spectroscopic study and evaluation of red-adsorbing fluorescent dyes

Bioconjugate Chem. 14, 195-204

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2000):

Biological and Chemical Terrorism, Strategic Plan for Preparedness and Response

Morbidity and Mortality Weekly Report 49, No. RR-4

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2003):

Bioterrorism Agents/Diseases List

<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist.asp>

COPELAND, S., J. SIDDIQUI UND D. REMICK (2004):

Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines

J. Immunol. Meth. 284, 99-106

CRAS, J., C. ROWE-TAITT, D. NIVENS UND F. LIGLER (1999):

Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization

Biosens. Bioelectron. 14, 683-688

CUTLER, P. (2003):

Protein arrays: the current state-of-the-art

Proteomics 3, 3-18

DELEHANTY, J. UND F. LIGLER (2002):

A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria

Anal. Chem. 74, 5681-5687

DELEHANTY, J. UND F. LIGLER (2003):

Method for printing functional protein microarrays

BioTechniques 34, 380-385

DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE (DOHMH) OF THE NEW YORK CITY: (2004):

Bureau of Communicable Disease

<http://www.nyc.gov/html/doh/html/cd/cd.html>

EKINS, R. (1989):

Multi-analyte immunoassay

J. Pharmacol. Biomed. Anal. 7, No.2: 155-168

EKINS, R. (1998):

Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays

Clin. Chem. 44, 9; 2015-2030

EKINS, R. UND F. CHU (1992):

Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical 'compact disk of the future

Ann. Biol. Clin. 50, 337-353

FALL, B. I., B. EBERLEIN-KÖNIG, H. BEHERENDT, R. NIESSNER, J. RING UND M. G. WELLER (2003):

Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in human serum

Anal. Chem. 75, 556-562

GIJLSWIJK VAN, R. P. M., D. J. VAN GIJLSWIJK-JANSSEN, A. K. RAAP, M.R. DAHA UND H. J. TANKE (1996):

Enzym-labelled antibody-avidin conjugates: new flexible and sensitive immunochemical reagents

J. Immunol. Meth. . 189, 117-127

GLÖCKLER, J. UND P. ANGENDT (2003):

Protein and antibody microarray technology

J. Chromatogr. B 797, 229-240

GOLDEN, J. P. UND F. LIGLER (2002):

A comparison of imaging methods for use in an array biosensor

Biosen. Bioelectron. 17, 719-725

GRUNOW, R., W. SPLETTSTOESSER, S. McDONALD, C. OTTERBEIN, T. O'BRIEN, C. MORGAN, J. ALDRICH, E. HOFER, E.-J. FINKE UND H. MEYER (2000):

Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzym-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and PCR

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 86-90

HÖSEL, W., J. GROSS, R. MOLLER, B. KANNE, A. WESSNER, G. MÜLLER, E. GROMNICA-IHLE, M. FROMME, S. BISCHOFF UND A. HASELBECK (2004):

Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera

J. Immunol. Meth. . 294, 101-110

JUNG, R. (1988):

Staphylokokken-Enterotoxin E – Nachweis mittels ELISA sowie Reinigung mit Hilfe Affinitätsgereinigter Antikörper
Diss. med. vet. München

JUNG, G. UND G. STEPHANOPOPOULOS (2004):

A functional protein chip for pathway optimaization and in vitro metabolic engineering
Science 304, 428-431

KEIL, C. (1999):

Reinigung von *Escherichia coli* Shigatoxinen und Produktion von poly- und monoklonalen Antikörpern
Diss. med. vet. München

KIYONAKA, S., K. SADA, I. YOSHIMURA, S. SHINKAI, N. KATO UND I. HAMACHI, (2004):

Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel
Nat. Material 3, 58-64

KLEE, S. R., D. JACOB, H. NATTERMANN UND B. APPEL (2003):

Bioterroristisch relevante bakterielle Erreger
Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 11, 935-948

KNECHT, B. G., A. STRASSER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER, R. NIESSNER UND M. G. WELLER (2004):

Automated microarray system fort the simultaneous detection of antibiotics in milk
Anal. Chem. 76, 646-654

KODADEK, T. (2001):

Protein microarrays: prospects and problems
Chem. Biol. 8, 105- 115

KODADEK, T. (2002):

Development of protein-detecting microarrays and related devices

Trends Biochem. Sc. 27, 295-300

KÖHLER, G. UND C. MILSTEIN (1975):

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

Nature, 256, 495-497

KUSNEZOW, A. JACOB, A. WALJEW, F. DIEHL UND J. D. HOHEISEL (2003):

Antibody microarrays: an evaluation of production parameters

Proteomics 3, 254-264

LI, Y. UND M. W. REICHERT (2003):

Adapting cDNA microarray formats to cytokine detection protein arrays

Langmuir 19, 1557-1566

LI, Y., N. NATH UND M.W. REICHERT (2003):

Parallel comparison of sandwich and direct label assay protocols on cytokine detection protein arrays

Anal. Chem. 75, 5274-5281

MACBEATH, G., A. KOEHLER UND S. SCHREIBER (1999):

Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse

J. Am. Chem. Soc: 121, 7967-7968

MACBEATH, G. UND S. SCHREIBER (2000):

Printing proteins as microarrays for high throughput function determination

Science 289, 1760-1763

MACBEATH, G. (2002):

Protein microarrays and proteomics

Nat. Gen. Supp. 32, 526-532

MÄRTLBAUER, E. (2004):

Immunchemische Methoden

In: BALTES, W und L. W. KROH (Hrsg.)

Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen, p. 289-293

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

MAY, M. (2004):

Building a better biosensor

The Scientist 5, 36-38

MENDOZA, L., P. McQUARY, A. MONGAN, R. GANGADHARAN, S. BRIGNAC UND M. EGGERS (1999):

High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

BioTechniques 27, 778-788

MITCHELL, P. (2002):

A perspective on protein Microarrays

Nat. Biotechnol. 20, 225-229

PELUSO, P., D. WILSON, D. DO, H. TRAN, M. VENKATASUBBIAH, D. QUINCY, B. HEIDECKER, K. POINDEXTER, N. TOLANI, M. PHELAN, K. WITTE, L. JUNG, P. WAGNER UND S. NOCK (2003):

Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays

Anal. Biochem. 312, 113-124

PETERS, J. H., UND H. BAUMGARTEN (HRSG.) (1990):

Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, 2. Auflage

Springer Verlag, Berlin

PYUN, J. C., H. BEUTEL, J.-U. MEYER, H. H. RUF (1998):

Developement of a biosensor for E. coli based on a flexural plate

Biosen. Bioelectron. 13, 839-845

RODA, A., M. GUARDIGLI, C. RUSSO, P. PASINI UND M. BARALDINI (2000):

Protein microdeposition using a conventional inkjet printer

BioTechniques 28, 492-496

ROGERS, K. UND C. L. GERLACH (1996):

Environmental biosensors: a status report

Environm. Sc. Technol. 30, A486-A491

ROLLE, M., A. MAYR UND M. BÜTTNER (2001):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage, pp. 445-461, 581

Enke Verlag Stuttgart

ROWE, C., S. SCRUGGS, M. FELDSTEIN, J. GOLDEN, F. LIGLER (1999):

An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes

Anal. Chem. 71, 433-439

ROWE, C., L. TENDER, S. SCRUGGS, M. FELDSTEIN, J. GOLDEN, F. LIGLER, B. MACCRAITH UND J. CRAS (1999):

Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral and protein analytes

Anal. Chem. 71, 3846-3852

ROWE-TAITT, C., J. CRAS, C. H. PATTERSON, J.P. GOLDEN UND F. LIGLER (2000):

A ganglioside-based assay for cholera toxin using an array biosensor

Anal. Biochem. 281, 123-133

ROWE-TAITT, C., J.P. GOLDEN, M. FELDSTEIN, J. CRAS, K. HOFFMAN UND F. LIGLER (2000):

Array biosensor for detection of biohazards

Biosen. Bioelectron. 14, 785-794

ROWE-TAITT, C., J. HAZZARD, M. FELDSTEIN, K. HOFFMAN, J. CRAS, J. GOLDEN UND F. LIGLER (2000):

Simultaneous detection of six biohazardous agents using a planar waveguide array biosensor

Biosen. Bioelectron. 15, 579-589

ROWE-TAITT, C., G. ANDERSON, B. LINGERFELT, M. FELDSTEIN UND F. LIGLER (2002):

Nine-analyte detection using an array-based biosensor

Anal. Chem. 74, 6114-6120

RUBINA, A. Y., I.E. DEMENTIEVE, A. A. STOMAKHIN, E. L. DARII, S. V. PAN'KOV, V.E. BARSKY, S. M. IVANOV, E. V. KONOVALOVA UND A. D. MIRZABEKOV (2003):

Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications

BioTechniques 34, 1008-1022

SHELLER, F. W., K. TIEPNER, UND A. WARSINKE (2004):

Anwendung von Biosensoren in der Lebensmittelanalytik

in BALTES, W und L. W. KROH (Hrsg.)

Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen, p. 273-277

Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

SCHUTZ, A., A. TANNAPFEL UND C. WITTEKIND (1999):

Comparison of different double immunostaining protocols for paraffin embedded liver tissue

Anal. Cell. Path. 18, 227-233

SCHWEIZER, B. UND S. F. KINGSMORE (2002):

Measuring proteins on microarrays

Curr. Op. Biotechn. 13, 14-19

SIMON, E. (1978):

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis von Satphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln am Model des Enterotoxin B nach dem ELISA-Prinzip

Diss. med. vet. München

SLETTSTOESSER, W. D., L. RAHLISON, R. GRUNOW, H. NEUBAUER UND S. CHANTEAU (2004):

Evaluation of a standardized F1 capsular antigen capture ELISA test kit for the rapid diagnosis of plague

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 41, 149-155

SWAMINATHAN, S.; W. FUREY, J. PLETCHER UND M. SAX (1992):

Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen
Nature, 359, 801-806.

TAUSSIG, M. (2003):

Protein arrays resource page

www.functionalgenomics.org.uk/sections/resources/protein_arrays.htm

THOMSEN, R., (2003):

Pocken als bioterroristische Bedrohung

Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz 46, 965-975

TONKINSON, J. L., D. S. OSBORNE, B. A. STILLMAN UND W. ZHAO (2003):

Smaller is better: developing microscale immunoassays for parallel analysis of multiple analytes

www.devicelink.com/ivdt/archive/03/03/001.html

TURNER, A. (1996):

Biosensors: Past, Present and Future

www.cranefield.ac.uk./biotech/chinap.htm

TURNER, A. (2001):

Biosensors 2000 - The sixth world congress on biosensors

Biosen. Bioelectron. 16, 609

TURNER, A. (2002):

Biosensors—sense and sensitivity

Science 290, (5495) 1315-1321

WATERBOER, T., P. SEHR, O. BRANDT, A. JACOB UND J. HOHEISEL (2004):

Simultaneous antibody detection using a chip and bead technology combined with in situ-purification of GST fusion proteins

Statusseminar Chiptechnologien 2004 Frankfurt

WELLER, M.G., A. J. SCHUETZ, M. WINKELMAIR UND R. NIESSNER (1999):

Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water
Anal. Chim. Acta 393, 29-41

WILLATS W. G. T., S. E. RASMUSSEN, T. KRISTENSEN, J. DALGAARD MIKKELSEN
UND J. P. KNOX (2002):

Sugar-coated microarrays: A novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans
Proteomics 2 1666-1671

WINKELMAIR, M., A. J. SCHUETZ, M. G. WELLER UND R. NIESSNER (1999):

Immunochemical array for the identification of cross-reacting analytes
Fresenius J. Anal. Chem. 363: 731-737

WOLFE, C. A. C. UND D. S. HAGE (1995):

Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate
Anal. Biochem. 231, 123-130

YANAGISAWA, H., A. HIRANO, UND M. SUGAWARA (2004):

A dot-blot method for quantification of apurinic/apyrimidinic sites in DNA using an avidin
plate and liposomes encapsulating a fluorescence dye
Anal. Biochem. 332 (2): 358-367

7 ANHANG

Anhang 1: Beispiel eines PASA-Testprogramms

Sub Immunomat_RunScript()

If immunomat.Washflowcell(1) = False Then Exit Sub

If immunomat.LoadPump(2,1000,0,0) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,400,1,150) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

:

:

55 Wiederholungen

:

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(2,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(100) = False Then Exit Sub

If immunomat.Washflowcell(1) = False Then Exit Sub

If immunomat.LoadPump(3,1000,0,0) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(3,400,1,150) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(3,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(3,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(3,10,1,17) = False Then Exit Sub

-Start

-Waschen

-Aufnahme der

Probe, sowie

fraktionierte

Injektion(Inkuba-

tionszeit insgesamt

ca. 5 Minuten)

-Waschen

-Aufnahme der

markierten

Antikörper, sowie

fraktionierte

Injektion

(Inkubationszeit

insgesamt ca. 5

Minuten)

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

Fortsetzung Anhang 1:

:

55 Wiederholungen

:

If immunomat.DispensePump(3,10,1,17) = False Then Exit Sub

Waschen

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(3,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(100)= False Then Exit Sub

If immunomat.Washflowcell(1) = False Then Exit Sub

If immunomat.LoadPump(5,1000,0,0) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(5,400,1,150) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(5,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(5,10,1,17) =False Then Exit Sub

*- Aufnahme der
Nachweisreagenzien,
sowie fraktionierte
Injektion
(Inkubationszeit
insgesamt ca. 5
Minuten)*

:

:

:

55 Wiederholungen

:

If immunomat.DispensePump(5,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(5,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(3) = False Then Exit Sub

If immunomat.DispensePump(5,10,1,17) = False Then Exit Sub

If immunomat.RunTimer(100)= False Then Exit Sub

Fortsetzung Anhang 1:

If immunomat.LoadFlowCell(1,5000) = False Then Exit Sub	-Waschen
If immunomat.LoadPump(4,1000,0,1000) = False Then Exit Sub	-Laden einer kleinen Waschpumpe
If immunomat.EnterSyncSection() = False Then Exit Sub	-gleichzeitiges
If immunomat.LoadPump(5,100,1,50) = False Then Exit Sub	Einpumpen von
If immunomat.DispensePump(4,1000,1,100) = False Then Exit Sub	Waschlösung und
If immunomat.ExitSyncSection() = False Then Exit Sub	Reflux der Nachweisreagenzien
If immunomat.Washflowcell(1) = False Then Exit Sub	-Waschen
If immunomat.LoadFlowCell(1,5000) = False Then Exit Sub	
If immunomat.EnterSyncSection() = False Then Exit Sub	-gleichzeitiges
If immunomat.LoadPump(6,500,0,100) = False Then Exit Sub	Aufziehen von Substrat
If immunomat.LoadPump(7,500,0,100) = False Then Exit Sub	und chemi-
If immunomat.ExitSyncSection() = False Then Exit Sub	lumineszierender Verbindung
If immunomat.EnterSyncSection() = False Then Exit Sub	
If immunomat.DispensePump(6,500,1,30) = False Then Exit Sub	-gleichzeitiges
If immunomat.DispensePump(7,500,1,30) = False Then Exit Sub	Einpumpen der
If immunomat.ExitSyncSection() = False Then Exit Sub	Substratkomponenten
If immunomat.AcquireImage(60000) = False Then Exit Sub	-Bilderstellung 1min
If immunomat.DispensePump(5,100,1,50) = False Then Exit sub	
If immunomat.WashFlowCell(1) = False Then Exit Sub	-Waschen
End Sub	-Ende